

FABRÍCIO ALANO PAMPLONA

**O SISTEMA CANABINÓIDE COMO MODULADOR DA
AQUISIÇÃO E EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS**

Florianópolis – SC

2006

FABRÍCIO ALANO PAMPLONA

O SISTEMA CANABINÓIDE COMO MODULADOR DA AQUISIÇÃO E EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Florianópolis – SC

2006

*“A curiosidade de saber
O que me prende? O que me paralisa?
É como se eu fosse prum Vietnã
lutar por algo que não será meu
A curiosidade de saber quem é você”*

Lula Queiroga, em
“Dois Olhos Negros”

“No matter how objective and simple it may appear, all description relies on personal interpretation – the author’s own point of view. It is well-known that man projects his personality on everything, and that when he believes he is photographing the outside world he is often observing and depicting himself.”

Santiago Ramón Y Cajal, em
“Advice for a young investigator”

Tradução do original em
espanhol por Swanson e Swanson

Dedico este trabalho

*a Deus, por ter concedido ao Homem o
privilégio de habitar uma Terra de belezas
infindáveis, onde se colhe tudo que se planta. E
ao Diabo, por ter achado a vida por aqui um
tédio e ter criado a cerveja e a Mulher, para
alívio da mente e do coração.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Alfa e Pedro Paulo, que pelo próprio exemplo me ensinaram os caminhos da bondade e da generosidade e que sempre me apoiaram nos momentos de indecisão;

À minha irmã Gabriela, cujos passos tenho seguido desde o nascimento e a quem agradeço pela convivência diária, que só é possível entre irmãos que se amem;

Ao professor Reinaldo, que com suas palavras de sabedoria e amizade tem guiado meus passos e torcido pelo sucesso da minha empreitada científica;

A todos os professores do Departamento de Farmacologia, que como exemplos de seriedade e competência me motivaram pela escolha da carreira científica;

Ao meu amigo Leandro Vendruscolo, que com seu criticismo foi capaz de fazer perceber a um novato como a ciência deve ser conduzida em seu cotidiano;

Aos colegas de laboratório e amigos Pablo Pandolfo e Rui Daniel S. Prediger pela colaboração em parte dos experimentos realizados neste estudo;

Aos colegas de laboratório Luciano, Pablo, Rui, Vanessa, Rafael e Meigui e aos ex-colegas George e Assini pelo companheirismo, amizade e bom humor que sempre nortearam a convivência em nosso laboratório;

Aos colegas Filipe, Rodrigo, Dani Duma, Belém, Jarbas, Daniel, Emerson, Rafael, Sofia, Rui, Gustavo, Geison e Maria pelas várias horas que passamos juntos pensando, debatendo, criando e construindo juntos o I e o II Cursos de Inverno em Farmacologia, que trouxeram alegria e felicidade na mesma medida em que requereram esforços e ações em equipe;

Aos funcionários da Farmacologia, Pedro, Redna, Rita, Diana e aos demais funcionários que foram sempre muito solícitos comigo quando precisei;

A todas as pessoas que de uma maneira ou de outra contribuem para que eu possa concretizar as loucuras que me vêm à mente;

À Sanofi-Aventis, por ter gentilmente doado uma das drogas utilizadas neste estudo;

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – ASPECTOS HISTÓRICOS E EFEITOS DO USO DE <i>CANNABIS SATIVA</i> 1	
1.2 - RECEPTORES CANABINOIDES E O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE.....	6
1.3 - POTENCIALIDADES TERAPÊUTICAS DO SISTEMA CANABINÓIDE.....	17
1.4 - COMPORTAMENTO DEFENSIVO, MEMÓRIAS AVERSIVAS E OS MODELOS ANIMAIS DE CONDICIONAMENTO AVERSIVO.....	21
2 – OBJETIVO	29
2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 – ANIMAIS.....	31
3.2 – DROGAS.....	31
3.3 – PROCEDIMENTOS.....	32
3.3.1 – Condicionamento Aversivo.....	32
3.3.1.1 – Condicionamento aversivo contextual	33
3.3.1.2 – Condicionamento aversivo auditivo.....	36
3.3.1.3 – Participação dos receptores canabinóides CB ₁ nos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual	37
3.3.1.4 - Avaliação de aprendizado dependente de estado no condicionamento aversivo contextual.....	38
3.3.1.5 – Participação dos receptores canabinóides CB ₁ nos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a extinção de memórias aversivas antigas	39
3.3.2 – Avaliação Motora.....	41
3.3.3 – Labirinto em Cruz Elevado Potencializado pelo Medo	41
3.3.4 – Tarefa Reversa do Labirinto Aquático	43

3.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 – RESULTADOS.....	46
4.1 – CONDICIONAMENTO AVERSIVO	46
4.1.1 – Efeitos do Agonista Canabinóide WIN55212-2 e do Antagonista Canabinóide SR147778 na Aquisição do Condicionamento Aversivo Contextual	49
4.1.2 – Efeitos do Agonista Canabinóide WIN55212-2 e do Antagonista Canabinóide SR147778 na Consolidação do Condicionamento Aversivo Contextual	51
4.1.3 – Efeitos do Agonista Canabinóide WIN55212-2 e do Antagonista Canabinóide SR147778 na Evocação do Condicionamento Aversivo Contextual	52
4.1.4 – Efeitos do Agonista Canabinóide WIN55212-2 e do Antagonista Canabinóide SR147778 na Extinção do Condicionamento Aversivo Contextual	54
4.1.5 – Efeito do Agonista Canabinóide WIN55212-2 na Aquisição do Condicionamento Aversivo Auditivo	59
4.1.6 – Participação dos Receptores Canabinóides CB1 no Prejuízo de Aquisição do Condicionamento Aversivo Contextual Induzido pelo Agonista Canabinóide WIN55212-2	61
4.1.7 – Avaliação de Aprendizado Dependente de Estado no Condicionamento Aversivo Contextual	62
4.1.8 – Participação dos Receptores Canabinóides CB1 nos Efeitos do WIN55212-2 na Extinção de Memórias Aversivas Antigas	64
4.2 – AVALIAÇÃO MOTORA	67
4.3 – LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO POTENCIALIZADO PELO MEDO	68
4.4 – TAREFA REVERSA DO LABIRINTO AQUÁTICO	71
5 – DISCUSSÃO	73
CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXO	119

LISTA DE ABREVIações

ANOVA – Análise de variância

a.C – Antes de Cristo

EUA – Estados Unidos da América

AMPc – Adenosina monofasfato cíclica

MAPk – Proteína quinase ativada por mitógeno

JNK – quinase N-terminal do c-jun

SNC – Sistema nervoso central

GABA – Ácido δ -amino-butírico

CCK - colecistoquinina

RNA_m – ácido ribonucleico

2-AG – 2 araquidonilglicerol

IUPHAR – International Union of Pharmacology

SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

FDA – Food and Drug Administration

LCE – Labirinto em cruz elevado

CA – Condicionamento aversivo

EC – Estímulo condicionado

EI – Estímulo incondicionado

i.c.v. – intracerebroventricular

i.p. – intraperitoneal

LTD – Depressão de longa duração

LTP – Potenciação de longa duração

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das estruturas moleculares dos constituintes naturais de maior concentração encontrados na *Cannabis sativa*. . 4

Figura 2 – Representação esquemática das estruturas moleculares dos endocanabinóides identificados e caracterizados até o momento. 11

Figura 3 – Representação esquemática das estruturas moleculares de agonistas e antagonistas canabinóides sintéticos. 15

Figura 4 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual..... 34

Figura 5 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 sobre a consolidação do condicionamento aversivo contextual..... 34

Figura 6 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 sobre a evocação do condicionamento aversivo contextual..... 35

Figura 7 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual..... 36

Figura 8 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a aquisição do condicionamento aversivo auditivo.....	37
Figura 9 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação da participação de receptores CB1 nos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual.....	38
Figura 10 – Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação da participação dos receptores canabinóides CB ₁ nos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a extinção de memórias aversivas antigas.	40
Figura 11 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 sobre o desempenho de animais na tarefa reversa do labirinto aquático.	44
Figura 12 – Padronização do condicionamento aversivo contextual.....	47
Figura 13 – Padronização do condicionamento aversivo auditivo.....	48
Figura 14 – Efeito da administração do agonista canabinóide WIN sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual.....	49
Figura 15 – Efeito da administração do antagonista canabinóide SR sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual.....	50
Figura 16 – Efeito da administração do agonista canabinóide WIN sobre a consolidação do condicionamento aversivo contextual.....	51

Figura 17 – Efeito da administração do antagonista canabinóide SR sobre a consolidação do condicionamento aversivo contextual.....	52
Figura 18 – Efeito da administração do agonista canabinóide WIN sobre a evocação do condicionamento aversivo contextual	53
Figura 19 – Efeito da administração do antagonista canabinóide SR sobre a evocação do condicionamento aversivo contextual	54
Figura 20 – Efeito da administração do agonista canabinóide WIN sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual	56
Figura 21 – Efeito da administração do antagonista canabinóide SR sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual	58
Figura 22 – Efeito da administração do agonista canabinóide WIN sobre a aquisição do condicionamento aversivo auditivo.....	60
Figura 23 – Participação dos receptores CB1 nos efeitos do agonista canabinóide WIN sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual ..	61
Figura 24 – Avaliação de aprendizado dependente de estado no condicionamento aversivo contextual.....	63
Figura 25 – Participação dos receptores CB1 no efeito da administração do agonista canabinóide WIN sobre a extinção de memórias aversivas antigas	65
Figura 26 – Efeito da administração do agonista canabinóide na atividade locomotora dos animais	68

Figura 27 – Efeito da administração de WIN e SR sobre a tarefa reversa do labirinto aquático	72
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais da avaliação de aprendizado dependente de estado no condicionamento aversivo contextual	39
Tabela 2 – Grupos experimentais da avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-255212-2 no labirinto em cruz elevado potencializado pelo medo.....	42
Tabela 3 – Efeito do agonista canabinóide WIN (0.25 mg/kg, i.p.) no comportamento dos animais avaliados no labirinto em cruz elevado.....	69

RESUMO

A administração de agonistas canabinóides prejudica a formação de memórias e de maneira oposta, a administração de antagonistas canabinóides parece melhorar os processos de aquisição e consolidação em modelos animais. No entanto, nem todos os tipos de memória são afetados pelo sistema canabinóide. Pouco se sabe, por exemplo, a respeito do efeito da manipulação deste sistema sobre memórias aversivas, relacionadas ao desenvolvimento de patologias de ansiedade ligadas à recordação de eventos traumáticos, como o estresse pós-traumático. As memórias aversivas são comumente estudadas em modelos animais de condicionamento aversivo (CA), nos quais o animal aprende que um estímulo condicionado neutro (EC) precederá um estímulo incondicionado nocivo (usualmente um choque nas patas). Quando re-expostos ao EC, os animais exibem respostas comportamentais defensivas, como o congelamento. Na extinção do condicionamento aversivo, realizam-se sucessivas re-exposições ao EC, na ausência do choque, e observa-se a diminuição do tempo de congelamento, caracterizando o aprendizado de que o EC não estará mais associado ao estímulo aversivo. Evidências recentes demonstraram a participação de receptores canabinóides CB1 no processo de extinção do CA, ressaltando a importância do estudo da influência do sistema canabinóide sobre as memórias aversivas neste modelo. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da injeção i.p. do agonista canabinóide WIN55212-2 (WIN; 0,25-5,0 mg/kg) e do antagonista canabinóide SR147778 (SR; 0,2 – 2,0 mg/kg) sobre as etapas de aquisição, consolidação, evocação e extinção do CA em ratos. No CA auditivo, os ratos permaneceram por 3 min em uma gaiola de condicionamento e um som foi emitido (80 dB, 1000 Hz por 10 s) concomitantemente a um choque nas patas (1,5 mA por 1 s). Os animais permaneceram por mais 1 min na gaiola de condicionamento. No CA contextual os ratos permaneceram por 3 min na gaiola de condicionamento, receberam o choque, e 1 min após foram retirados da gaiola. No teste, os animais foram reexpostos ao respectivo EC, mas não receberam choque. O tempo de congelamento (s) foi adotado como índice de memória. Também foram analisados os efeitos do WIN e SR na tarefa reversa do labirinto aquático e no labirinto em cruz elevado (LCE) potencializado pelo medo. A administração de WIN (2,5 e 5,0 mg/kg, i.p.) foi capaz de prejudicar a aquisição do CA contextual, mas não do CA auditivo. Estes resultados não tiveram influência de locomoção ou de aprendizado dependente de estado e foram relacionados à ativação de receptores canabinóides CB1. Além disso, a extinção do CA contextual foi bloqueada pela administração de SR (1,0 e 2,0 mg/kg, i.p.) e facilitada pela administração de WIN (0,25 mg/kg, i.p.). A facilitação da extinção induzida pelo WIN foi relacionada à ativação dos receptores CB1 e não foi relacionada diretamente a alterações em comportamentos tipo ansiedade avaliados no LCE potencializado pelo medo. A administração i.p. de SR (1,0 mg/kg) e WIN (0,25 mg/kg), respectivamente, prejudicaram e facilitaram a execução da tarefa reversa do labirinto aquático. Pela modulação das etapas de aquisição e extinção do CA, sugere-se que uma farmacoterapia tendo como alvo o sistema canabinóide poderia representar uma nova abordagem terapêutica para patologias de ansiedade relacionadas à lembrança de eventos traumáticos.

ABSTRACT

The effects of the pharmacological manipulation of the cannabinoid system have been found in several behavioral paradigms. Nevertheless, there is evidence that not all types of memory are impaired after cannabinoid administration. Little is known about the influence of the cannabinoid system on aversive memories, which are linked to the development of anxiety disorders related to the retrieval of traumatic experiences, such as the posttraumatic stress disorder. These aversive memories are commonly studied using animal models of fear conditioning. In this paradigm, an emotionally neutral conditioned stimulus (CS), such as a tone, elicits behavioral responses after association with a noxious aversive unconditioned stimulus (US), such as a brief electric footshock. Once the CS-US association is learned, innate physiological and behavioral responses to threats come under the control of the CS. Conditioned emotional responses are also elicited by contextual stimuli which are present in the conditioning chamber during conditioning. Tone fear conditioning represents the association of a simple, well-defined, explicit cue to the US, whereas conditioning to the context represents the association between the US and several cues of multiple sensorial modalities, which requires hippocampal integration into a unified configural representation of the environment. Post-conditioning re-exposure to the respective CS elicits a marked freezing response and repeated or sustained presentation of the same CS in the absence of the US results in a progressive decrease in the freezing response, a phenomenon called extinction. Recently, it was reported that KO mice for the CB1 cannabinoid receptor showed impaired extinction of fear memories, highlighting the influence of the pharmacological manipulation of the endocannabinoid system on the aversive memories. Hence, the aim of the present study was to evaluate the effects of the exogenous cannabinoid agonist WIN55212,2 (WIN) and the novel cannabinoid CB1 receptor antagonist SR147778 (SR) on the acquisition, consolidation, retrieval and extinction of fear conditioning in rats. For tone fear conditioning, male Wistar rats were placed in the conditioning chamber and after 3 min, a sound (CS, 80 dB, 1000 Hz) was presented for 10 s that terminated with a 1-s electric footshock (1.5 mA). For contextual fear conditioning a similar procedure was used, but no sound was presented. For testing, the animals were re-exposed to the respective CS (tone or conditioning chamber) and the freezing behavior was registered. WIN (2.5 or 5.0 mg/kg, i.p.) administration impaired contextual fear conditioning but did not modify the freezing behavior elicited by tone presentation. The administration of SR (1.0 or 2.0 mg/kg, i.p.) and WIN (0.25 mg/kg, i.p.) prior to extinction training disrupted and facilitated, respectively, the extinction of contextual fear-memory. The facilitative effect of WIN on memory extinction was not related to alterations in anxiety-like behavior in the fear-potentiated plus-maze and does not seem to be specific to contextual fear-memory, since it was also observed in the water-maze reversal task. The modulation of acquisition and extinction of fear memories by the manipulation of the cannabinoid system suggests cannabinoid receptor agonists as a new therapeutic approach to treat anxiety disorders related to the retrieval of traumatic experiences.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – ASPECTOS HISTÓRICOS E EFEITOS DO USO DE *CANNABIS SATIVA*

A *Cannabis sativa* é provavelmente uma das primeiras plantas não-alimentícias cultivadas pelo homem, cuja produção foi originalmente introduzida pelos povos orientais. As primeiras evidências arqueológicas da utilização de algum dos derivados da *Cannabis* por populações humanas data de cerca de 10.000 anos atrás, quando fibras do cânhamo eram utilizadas em Taiwan para a fabricação de cordas e vestuário (Childers e Breivogel, 1998). Na Índia, a *Cannabis* foi e continua sendo usada até hoje como parte de rituais religiosos, além de que o haxixe, a resina extraída desta planta, é conhecida no mundo árabe desde o século X. Além disso, existem registros históricos de que os chineses a utilizam de forma medicinal desde cerca de 2.700 a.C. para o tratamento de diversas condições patológicas (Abel, 1980). Somente a partir de meados do século XIX é que a medicina ocidental passou a conhecer e a se interessar pelo potencial terapêutico da *Cannabis* através de pesquisas coordenadas pelo Dr. William Brooke O'Shaughnessy (O'Shaughnessy, 1843). A descrição dos efeitos da *Cannabis* encontrada na Farmacopéia Britânica demonstra a curiosidade que esta planta despertava naquela época (Piomelli, 2003):

“Numerous observers have described the Indian hemp as producing in the natives of the East, who familiarly use it instead of intoxicating spirits, sometimes a heavy, lazy state of agreeable reverie, from which the individual may be easily roused to discharge any simple duty — sometimes a cheerful, active state of inebriation causing him to dance, sing and laugh, provoking the venereal appetite, and increasing the desire for food — and sometimes a quarrelsome drunkenness, leading to acts of violence. During this condition pain is assuaged and spasm arrested. [...] On the whole, it is a remedy which deserves a more extensive inquiry than any hitherto instituted.”

O uso medicinal da *Cannabis* foi bastante intenso na Europa durante o século XIX, quando se preconizava o seu uso como anticonvulsivante, analgésico, ansiolítico, antiemético e como remédio para o alívio de espasmos musculares, asma e enxaqueca. É interessante que o uso da *Cannabis* era amplamente difundido entre as classes sociais, tendo sido inclusive prescrita para a rainha Victoria da Inglaterra para o alívio de cólicas menstruais e para o tratamento da dismenorréia (Baker *et al.*, 2003). Contudo, a despeito destas possibilidades terapêuticas, no início do século XX o uso medicinal da *Cannabis* se deparou com pressões sócio-políticas importantes que levaram ao declínio do seu uso e, pelo menos nos Estados Unidos da América (EUA), as pesquisas com *Cannabis* foram cessadas quase que completamente em 1906. Esta série histórica culminou em 1937 quando o congresso americano editou o Decreto de Proibição da Maconha (*Marijuana Tax Act*) proibindo o cultivo, comercialização e uso dos derivados desta planta (Chalsma e Boyurn, 1994). Apesar da ilegalidade, em países como a Inglaterra a *Cannabis* continuou sendo utilizada como medicamento pela

população, alimentando as reivindicações por pesquisas que comprovassem os benefícios observados em certas condições patológicas (Baker *et al.*, 2003).

Em 1964, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) foi isolado e identificado a partir do haxixe e vem sendo reconhecido como o constituinte majoritário da *Cannabis* e principal responsável pelos efeitos psicoativos desta planta (Gaoni e Mechoulam, 1964; Karniol e Carlini, 1973), apesar de cerca de outros 60 canabinóides naturalmente obtidos da *Cannabis*, como o canabigerol, canabidiol, cannabinol, canabicromeno e o canabicitrol já terem sido descritos (Makriyannis *et al.*, 2005). A partir de 1971, em decorrência dos avanços que se sucederam na identificação química de compostos da *Cannabis* e estudos de sua farmacologia e toxicologia, a classificação da *Cannabis* e seus derivados foi modificada pelas Nações Unidas para a classe II da Convenção de Drogas Psicotrópicas, o que significa que “seu uso médico pode ser considerado desde que se tenha severo controle sobre a produção, comercialização e estocagem”, contribuindo em muito para as pesquisas científicas que buscam a caracterização dos efeitos fisiológicos dos derivados de *Cannabis* e a avaliação de seu potencial terapêutico (Carlini, 2004).

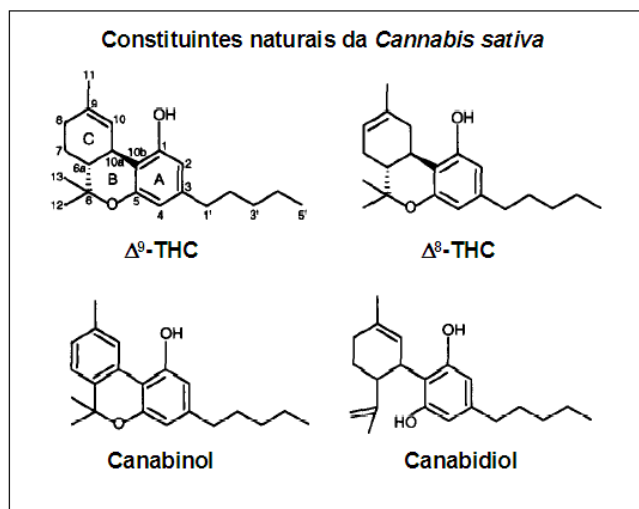


Figura 1 – Representação esquemática das estruturas moleculares dos constituintes naturais de maior concentração encontrados na *Cannabis sativa*. Adaptado de Pertwee (1997).

Os efeitos agudos dos canabinóides originalmente descritos em usuários de maconha incluem problemas cognitivos gerais, sensação de dilatação do tempo, leves alterações visuais e auditivas, incoordenação motora, sonolência, boca seca, fome exagerada, vermelhidão nos olhos, alterações de humor (euforia ou disforia), taquicardia, hipotensão e diminuição do tônus muscular (“relaxamento”) (Hollister, 1986). Apesar de diversos estudos clínicos terem sido realizados, há poucos relatos de efeitos canabinóides crônicos em usuários de maconha, incluindo uma possível maior probabilidade de hipóxia, ganho de peso corporal, bradicardia, diminuição geral de motivação, diminuição dos níveis séricos de testosterona e uma incerta diminuição da resposta imune inata (Hollister, 1986; Carlini, 2004). Curiosamente, apesar de existirem evidências de que o uso repetido da maconha possa gerar tolerância aos seus efeitos fisiológicos (Renault *et al.*, 1974; Bellville *et al.*, 1976), há raros relatos de síndrome de abstinência em

humanos (Bensusan, 1971) e não se tem informações conclusivas sobre o seu potencial em causar dependência; o que levou pesquisadores a considerarem a maconha uma droga relativamente segura se utilizada de uma maneira “social”, comparada ao álcool e ao tabaco, largamente utilizados pelas populações ocidentais (Hollister, 1986). No entanto, há que se salientar que altas doses de maconha mesmo em administração aguda podem principiar crises de pânico, delírio e psicose, em geral relacionadas a usuários inexperientes, a um alto grau de apreensão apresentado pelo indivíduo ao fazer uso de uma substância ilegal como a maconha ou a indivíduos que já possuíam predisposição a doenças psiquiátricas desta natureza (Annis e Smart, 1973). Além disso, o uso continuado de doses altas de THC pode desenvolver um quadro de intoxicação crônica caracterizado por apatia, letargia, morosidade, dificuldade de julgamento, problemas de concentração e memória (Tennant e Groesbeck, 1972). No entanto, os efeitos desta droga sobre a memória são ainda alvos de estudo. Um estudo bastante completo realizado com usuários crônicos de maconha demonstrou que tarefas cognitivas de avaliação de memória explícita foram prejudicadas pelo consumo oral de Δ^9 -THC, enquanto tarefas de avaliação de memória implícita não foram afetadas (Curran *et al.*, 2002). Neste mesmo estudo, tarefas de memória de trabalho foram levemente prejudicadas pelo tratamento com altas doses de Δ^9 -THC, embora outros estudos tenham demonstrado que a execução deste tipo de tarefa pode ser severamente prejudicada em indivíduos que consumiram maconha (Heishman *et al.*, 1997). Da mesma forma, um estudo utilizando uma tarefa mais refinada de avaliação cognitiva (*delayed non-match to sample*) foi inconclusivo sobre este assunto, demonstrando que os efeitos deletérios do Δ^9 -THC sobre a

cognição são dependentes do intervalo de tempo utilizado entre a primeira exposição de um estímulo e o teste de memória (Lane *et al.*, 2005).

1.2 - RECEPTORES CANABINOIDES E O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

As propriedades psicoativas da *Cannabis* e do Δ^9 -THC foram rapidamente reconhecidas, mas a estrutura até então incomum deste composto dificultava a busca por um mecanismo de ação plausível. Além do mais, a estrutura lipídica do Δ^9 -THC parecia sugerir que os efeitos da *Cannabis* estariam relacionados meramente à alteração da fluidez de membranas biológicas ao invés de serem produzidos pela interação entre o Δ^9 -THC e um receptor farmacológico específico (Hillard *et al.*, 1985; Piomelli, 2003), ainda que estudos farmacológicos indicassem uma relação estrutura-atividade para os canabinóides compatível com um mecanismo baseado na interação com proteínas receptoras (Dewey, 1986; Childers e Breivogel, 1998; Piomelli, 2003). Este dilema foi resolvido quando Howlett e Fleming (1984) demonstraram que canabinóides inibem a produção de AMPc em cultura de células, sugerindo um sistema de transdução mediado pela ativação de proteínas G. Esta descoberta foi seguida pelo ensaio de ligação com radioativos (*binding*) para receptores canabinóides (Devane *et al.*, 1988), pela localização destes receptores por imunohistoquímica (Herkenham *et al.*, 1990), além da clonagem e seqüenciamento do primeiro receptor canabinóide, denominado CB₁ (Matsuda *et al.*, 1990). Atualmente são conhecidos dois tipos de receptores canabinóides, os CB₁ e os CB₂, embora existam evidências de pelo menos mais um tipo de receptor canabinóide não-CB₁, não-CB₂ (Howlett *et al.*,

2002; Piomelli, 2003; Pertwee, 2005b). Os receptores CB₁ foram clonados de tecidos de ratos, camundongos e humanos e apresentam uma identidade de 97 a 99% dos seus aminoácidos entre as espécies (Howlett *et al.*, 2002). Os receptores CB₂ possuem cerca de 48% de homologia com os receptores CB₁ e a estrutura de ambos é a de um receptor com domínio de sete alças transmembranares, indo ao encontro de experimentos bioquímicos e celulares que sugeriam um mecanismo de transdução de sinal via acoplamento a proteína G para os receptores canabinóides (Howlett e Fleming, 1984). Enfatizando, ambos os receptores canabinóides CB₁ e CB₂ são receptores acoplados à proteína G_{i/o} e exercem seus efeitos fisiológicos pela inibição da atividade da adenilato ciclase, com conseqüente diminuição dos níveis intracelulares de AMPc (Felder *et al.*, 1993; Vogel *et al.*, 1993). Além disso, a ativação de receptores canabinóides pode dar início a uma cascata de ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPk) (Bouaboula *et al.*, 1995) e sinalização mediada por genes de expressão rápida, como c-FOS (Patel *et al.*, 1998) e a quinase N-terminal do c-Jun (JNK) (Rueda *et al.*, 2000). Os receptores CB₁ também podem aumentar a condutância de canais de potássio (Henry e Chavkin, 1995; Mackie *et al.*, 1995) ou diminuir a condutância de canais de cálcio atuando indiretamente pela ativação de proteína G e produção de segundos mensageiros (Felder *et al.*, 1993; Mackie *et al.*, 1995; Gebremedhin *et al.*, 1999).

Os receptores CB₁ são expressos predominantemente em tecidos nervosos da periferia e do sistema nervoso central (SNC) e podem ser encontrados em maiores concentrações em fibras axonais, especialmente localizados em botões terminais de neurônios pré-sinápticos (Hajos *et al.*, 2000; Katona *et al.*, 2000).

Pode-se considerar que os receptores CB₁ encontram-se distribuídos amplamente por todo o cérebro e em níveis comparáveis aos encontrados para os receptores ligados a canais iônicos, sendo considerados os receptores acoplados à proteína G de maior abundância no SNC (Greenamyre *et al.*, 1984; Herkenham *et al.*, 1990; Howlett *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003). Concentrações particularmente altas de receptores CB₁ foram encontradas nos gânglios da base (substância negra, estriado e globo pálido), no cerebelo, córtex, amígdala e hipocampo, regiões cerebrais que estão relacionadas com os efeitos comportamentais conhecidos dos canabinóides (Herkenham *et al.*, 1990). Níveis mais baixos de receptores CB₁ foram encontrados no hipotálamo e na medula espinhal, sendo praticamente ausentes nos centros respiratórios do tronco cerebral, de acordo com as observações clínicas de baixíssima letalidade para a overdose de canabinóides (Robson, 2001). Estudos de imunohistoquímica confirmaram as localizações encefálicas dos receptores CB₁ e enfatizaram que altos níveis de receptores CB₁ são encontrados nas fibras axonais, especialmente na extremidade terminal (Tsou *et al.*, 1998; Katona *et al.*, 2000). Mais detalhadamente, estudos utilizando microscopia eletrônica em fatias de hipocampo descreveram que os receptores CB₁ nesta preparação são encontrados quase que exclusivamente em terminais neuronais pré-sinápticos de neurônios GABAérgicos e de colecistocinina (CCK) (Hajos *et al.*, 2000; Katona *et al.*, 2000). Outro estudo em tecido hipocampal demonstrou que os receptores CB₁ são expressos em toda a membrana do terminal pré-sináptico, com exceção da zona ativa, enquanto estudos de tecido do estriado demonstraram uma expressão mais abrangente dos receptores CB₁, incluindo elementos pós-sinápticos e glia (Rodriguez *et al.*, 2001). Fora do sistema

nervoso os receptores CB₁ podem ser encontrados em tecidos periféricos como as glândulas pituitária e adrenal, células do sistema imune, medula óssea, coração, pulmões, timo, fígado, e tecidos de órgãos reprodutivos como a próstata e os testículos (Bouaboula *et al.*, 1993; Galieue *et al.*, 1995; Noe *et al.*, 2000; Pertwee, 2005a).

Os receptores CB₂, por sua vez, estão intimamente ligados a funções do sistema imune onde regulam a liberação de citocinas e a migração de células do sistema imune, podendo ser encontrados em diversos tecidos linfóides dentro ou fora do SNC (Pertwee, 2005a). Ensaios de hibridização *in situ* demonstraram a existência de RNAm para os receptores CB₂ no fígado, timo, amígdalas, medula óssea, pâncreas, assim como em macrófagos, monócitos e em uma ampla variedade de células imunes em cultura (Lynn e Herkenham, 1994; Buckley *et al.*, 1998). RNAm para os receptores canabinóides CB₂ também foi encontrado em tecido glial de córtex retirados de ratos recém-nascidos, inclusive em concentrações mais elevadas do que os níveis de RNAm para os receptores CB₁ encontrados na mesma preparação, demonstrando uma possível função dos receptores CB₂ no desenvolvimento cerebral (Carlisle *et al.*, 2002). Além do mais, estudo recente demonstrou enfaticamente a presença de receptores CB₂ funcionais no córtex, cerebelo e tronco cerebral de ratos, validadas farmacologicamente *in vivo* utilizando antagonistas seletivos para ambos os receptores CB₁ e CB₂ em um modelo animal de atividade anti-emética do Δ^9 -THC (Van Sickle *et al.*, 2005). Esta pode ser considerada a primeira evidência da participação dos receptores CB₂ em alguma função central do sistema canabinóide.

Após a identificação dos receptores canabinóides, utilizando a lógica de que um provável ligante endógeno do sistema canabinoide deveria ter propriedades químicas similares aos ligantes oriundos da *Cannabis*, Devane et al. (1992) utilizaram extratos de cérebro de suínos e isolaram compostos endógenos que se ligavam aos receptores canabinóides CB₁. Então, por definição, foram chamados de endocanabinóides os compostos endógenos que possuem a capacidade de ativar os receptores canabinóides. O primeiro endocanabinoide a ser caracterizado foi a etanolamina do ácido araquidônico, batizada por seu descobridor de anandamida, uma palavra derivada do sânscrito, que significa “êxtase, felicidade ou extrema alegria” (Childers e Breivogel, 1998). A anandamida se liga com afinidade moderada e é um agonista parcial dos receptores CB₁, além de ser um agonista fraco dos receptores CB₂ (Devane et al., 1992). A anandamida pertence à família das N-acil-etanolaminas, já conhecidas por sua atividade farmacológica. Outros compostos desta família são o homo- γ -linoleniletanolamina e o docosatetraeniletanolamida, ambos produzidos em neurônios e ligantes de receptores CB₁ (Bisogno et al., 2005). Além destes, nos últimos 10 anos outros derivados do ácido araquidônico foram identificados como endocanabinóides.

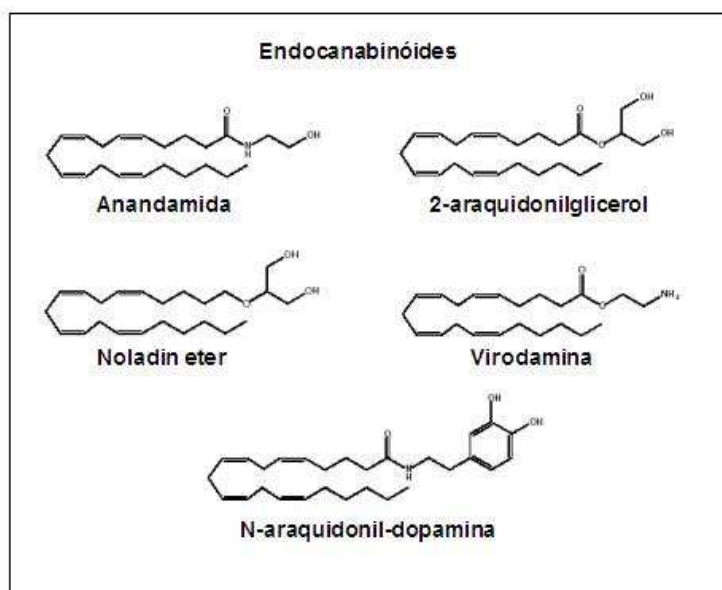


Figura 2 – Representação esquemática das estruturas moleculares dos endocanabinóides identificados e caracterizados até o momento. Adaptado de Bisogno *et al* (2005).

Um dos primeiros compostos endocanabinóides descobertos após a anandamida foi o 2-araquidonilglicerol (2-AG), um éster de araquidonato com glicerol que ativa ambos receptores CB₁ e CB₂, (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995) e mais recentemente o 2-araquidonilglicerol eter (“noladin eter”), um agonista seletivo dos receptores CB₁, O-araquidonil-etanolamina (“virodamina”), um agonista parcial dos receptores CB₂ e surpreendentemente um antagonista dos receptores CB₁ e a N-araquidonil-dopamina, um agonista seletivo dos receptores CB₁ e potente agonista dos receptores vanilóides (Bisogno *et al.*, 2000; Hanus *et al.*, 2001; Porter *et al.*, 2002). No entanto, embora diversos endocanabinóides venham sendo identificados, ainda pouco se sabe sobre a função fisiológica do noladin eter, da virodamina ou da N-araquidonil-dopamina e

até melhor caracterização, a anandamida e o 2-AG continuam sendo considerados os endocanabinóides protótipos (Bisogno *et al.*, 2005).

Uma característica bastante interessante dos endocanabinóides é que eles não são estocados e liberados através de vesículas como neurotransmissores clássicos. Ao invés disso, os endocanabinóides são sintetizados e liberados rapidamente pelos neurônios em decorrência de atividade elétrica induzida por despolarização e conseqüente influxo de íons cálcio (Di Marzo *et al.*, 1998). Além disso, há evidências de que a ativação de receptores metabotrópicos possa induzir a síntese neuronal de anandamida independentemente de influxo iônico (Giuffrida *et al.*, 1999). De toda maneira, uma regra geral para a síntese dos endocanabinóides é que eles são sintetizados a partir de fosfolipídios de membrana que são hidrolisados por fosfolipases às respectivas formas finais dos neurotransmissores (Bisogno *et al.*, 2005). A formação da anandamida, por exemplo, é realizada pela hidrólise de uma N-acil-fosfatidiletanolamina por uma fosfolipase D específica, enquanto o 2-AG é formado pela hidrólise de um acil-glicerol contendo o araquidonato na posição 2 catalisado por uma hidrolase de diacilgliceróis. Pouco se sabe a respeito das vias de síntese específicas para os outros endocanabinóides (Bisogno *et al.*, 2005). Ainda não se tem certeza se a liberação dos endocanabinóides a partir da membrana neuronal ocorre por simples difusão ou se algum mecanismo de difusão passiva ou carreamento por proteínas poderia facilitar o endereçamento dos endocanabinóides ao seus alvos celulares (Di Marzo *et al.*, 1994; Piomelli, 2003). Contudo, estipula-se que, uma vez sintetizados, os endocanabinóides ajam como mensageiros retrógrados, sendo liberados pela pós-sinapse, difundindo-se para a pré-sinapse e agindo nos

receptores canabinóides, muitas vezes diminuindo a probabilidade de liberação de outros neurotransmissores, por interferirem em uma etapa dependente de cálcio no processo de liberação de vesícula sináptica (Hoffman e Lupica, 2000). Também existem evidências de que, após a liberação, os endocanabinóides seriam capazes de se difundir através dos tecidos neurais, afetando regiões cerebrais relativamente distantes do seu local de liberação (Bisogno *et al.*, 1999). A inativação dos endocanabinóides ocorre por dois processos cooperativos, a recaptação e a degradação. Embora os endocanabinóides possam se difundir livremente pela membrana plasmática, a recaptação é facilitada por um sistema rápido e seletivo de carregamento, presente em neurônios e em células gliais (Di Marzo *et al.*, 1994; Beltramo *et al.*, 1997a; Hillard e Campbell, 1997). Aparentemente a recaptação é realizada pelo menos em parte por carreadores protéicos que realizam um transporte independente de energia, como o que acontece com outros lipídios biologicamente importantes. Embora um transportador específico ainda não tenha sido identificado, a recaptação da anandamida da fenda sináptica é saturável, dependente de energia e sensível à ação de inibidores, como seria de se esperar para um processo mediado por carreadores protéicos (Di Marzo *et al.*, 1994; Beltramo *et al.*, 1997a; Hillard e Campbell, 1997). Depois de recaptados, os endocanabinóides são metabolizados por enzimas de degradação específicas para cada ligante. A amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*) é responsável pela hidrólise da anandamida a etanolamina e ácido araquidônico e do 2-AG a glicerol e ácido araquidônico (Cravatt *et al.*, 1996; Goparaju *et al.*, 1999). O 2-AG também pode ser hidrolisado por uma lipase de monoacilgliceróis, que ao contrário da

FAAH, parece ser específica para este tipo de molécula, dada a sua incapacidade de catalisar a degradação da anandamida (Goparaju *et al.*, 1999).

Atualmente, diversos compostos que agem no sistema canabinóide tem sido desenvolvidos pela indústria farmacêutica, que vislumbra neste sistema relativamente novo, possibilidades terapêuticas até então desconhecidas. Além dos compostos naturalmente encontrados na *Cannabis* e dos já citados endocanabinóides, hoje em dia se dispõe de diversos compostos que agem na transmissão canabinóide, e que, aliado ao desenvolvimento de camundongos com deleção gênica para os receptores canabinóides constituem ferramentas para o aprofundamento dos conhecimentos acerca da farmacologia do sistema canabinóide. Segundo a *International Union of Pharmacology* - IUPHAR, os agonistas canabinóides podem ser classificados em canabinóides clássicos, canabinóides não-clássicos, aminoalquilindóis e eicosanóides (Howlett *et al.*, 2002).

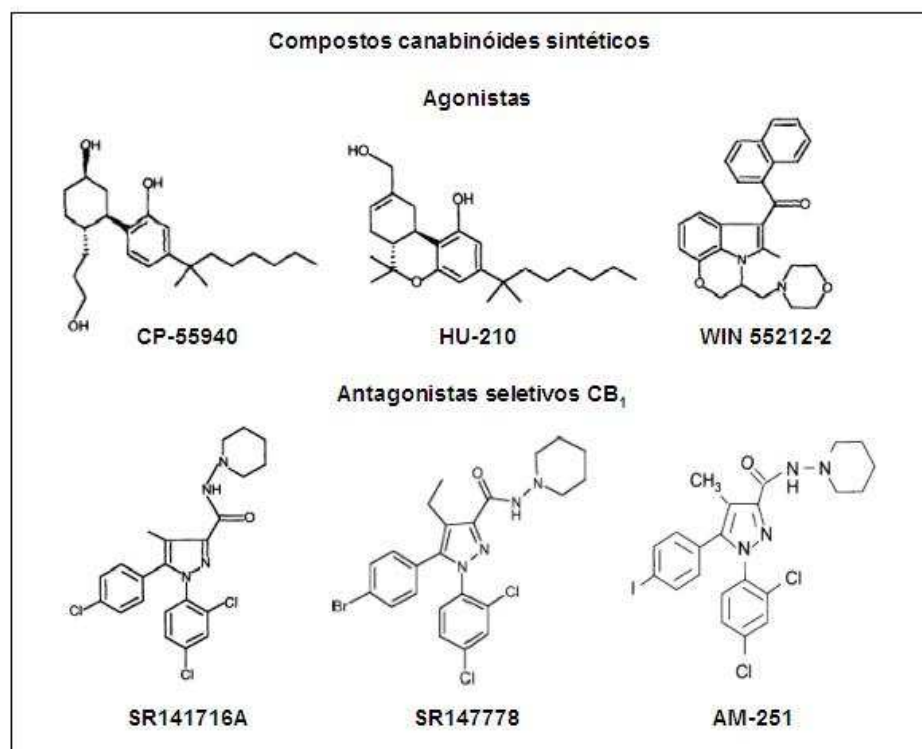


Figura 3 – Representação esquemática das estruturas moleculares de agonistas e antagonistas canabinóides sintéticos. O agonista WIN55212-2 e o antagonista SR147778 foram utilizados no presente trabalho. Adaptado de Pertwee (1997), Rinaldi-Carmona et al. (2004) e Fowler et al. (2005).

Os canabinóides clássicos são derivados do dibenzopirano tricíclico e sua classe inclui compostos que ocorrem naturalmente na *Cannabis*, como o Δ^9 -THC que atua como agonista parcial de ambos os receptores CB₁ e CB₂ e derivados sintéticos mais recentes, como o 11-hidróxi- Δ^8 -THC-dimetileptil (HU-210) que exibe uma seletividade para o receptor CB₁ (Howlett *et al.*, 2002). Modificações estruturais no Δ^9 -THC levaram ainda à obtenção de um agonista seletivo para os receptores CB₂, o HU-308 (Hanus *et al.*, 1999). Canabinóides não clássicos são formados por derivados sintéticos do Δ^9 -THC que não possuem o anel dihidropirano. O composto mais representativo desta classe é o CP-55940, um agonista total e bastante potente de ambos os receptores CB₁ e CB₂, cuja

marcação com trício permitiu a caracterização pioneira dos receptores CB₁ (Devane *et al.*, 1988; Herkenham *et al.*, 1990). Os aminoalquilindóis foram as primeiras moléculas com atividade canabimimética que não possuem similaridade estrutural com o Δ^9 -THC a serem desenvolvidas. Neste grupo, destaca-se o WIN552122, um agonista total e potente dos receptores CB₁ e CB₂ (Pacheco *et al.*, 1991). Os eicosanóides são constituídos pelos endocanabinóides protótipos, a anandamida e o 2-AG, que agem respectivamente como agonista parcial e total em ambos os receptores canabinóides CB₁ e CB₂. Além destes, modificações na estrutura química da anandamida levaram ao desenvolvimento da primeira geração de agonistas seletivos para os receptores CB₁, a R(+)-metanandamida, um análogo estável e potente da anandamida e a araquidonil-2-cloroetilamida (Gebremedhin *et al.*, 1999). Entre as moléculas que foram desenvolvidas como antagonistas canabinóides encontram-se os diarilpirazóis, benzofuranos substituídos, aminoalquilindóis e os derivados triazólicos. No grupo dos diarilpirazóis incluem-se os dois primeiros antagonistas seletivos sintetizados; o SR141716A, antagonista seletivo dos receptores CB₁ e o SR144528, antagonista seletivo dos receptores CB₂ que são considerados os antagonistas de referência. A principal desvantagem destes compostos é que eles não são antagonistas silenciosos, possuindo atividade intrínseca de agonistas inversos nos respectivos receptores (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994). Recentemente, modificações estruturais no SR141716A levaram ao desenvolvimento de um novo antagonista com alta seletividade para os receptores CB₁, o SR147778, com supostas melhorias em relação ao composto antigo (Rinaldi-Carmona *et al.*, 2004; Rodriguez De Fonseca

et al., 2005). Entre os benzofuranos substituídos encontra-se o LY320135, um antagonista dos receptores CB₁ que possui afinidade para receptores serotoninérgicos e muscarínicos (Felder *et al.*, 1998). A classe dos aminoalquilindóis inclui o AM630, um antagonista seletivo dos receptores CB₂, que também atua como agonista fraco dos receptores CB₁ (Howlett *et al.*, 2002). Finalmente, os triazóis incluem o LH-21 um antagonista que possui atividade *in vivo* com uma “paradoxal” baixa afinidade *in vitro* para os receptores CB₁ e destituído de atividade como agonista inverso (Jagerovic *et al.*, 2004). Além dos agonistas e antagonistas dos receptores canabinóides, há uma terceira classe de ferramentas farmacológicas que interferem com o metabolismo dos endocanabinóides. O primeiro e mais bem estudado entre os inibidores da recaptação/degradação de endocanabinóides é o AM404, um derivado estrutural da anandamida que age como substrato falso para o suposto transportador e para a enzima de degradação da anandamida, resultando em elevação nos níveis endógenos desse neurotransmissor e potencializando seus efeitos *in vivo* (Beltramo *et al.*, 1997b). Entre os inibidores seletivos da degradação de anandamida, destaca-se o URB597, pertencente a uma classe recentemente desenvolvida de carbamatos que induzem uma inibição irreversível da enzima FAAH (Tarzia *et al.*, 2003).

1.3 - POTENCIALIDADES TERAPÊUTICAS DO SISTEMA CANABINÓIDE

Atualmente, diversas funções fisiológicas e patológicas tem sido atribuídas ao sistema canabinóide, definido como todo o conjunto de receptores e ligantes

canabinóides juntamente com as enzimas e transportadores necessários ao seu funcionamento. Partindo dos estudos iniciais dos efeitos da *Cannabis* em seres humanos, diversas pesquisas tem sido realizadas em busca de um potencial terapêutico para o sistema canabinóide (Pertwee, 2005a). Atualmente, existem relatos da eficácia dos canabinóides no controle da dor, da êmese, no alívio dos sintomas da esclerose múltipla e na regulação do apetite. Outras potencialidades terapêuticas serão relacionadas, incluindo doenças que afetem o SNC e a periferia (Carlini, 2004; Makriyannis *et al.*, 2005). Uma das mais difundidas e bem aceitas idéias de potencial terapêutico para os canabinóides é a sua ação sobre a dor (Baker *et al.*, 2003). Agonistas canabinóides se mostraram eficazes em praticamente todos os experimentos utilizando modelos animais de dor física, tônica ou inflamatória, seja por agirem via receptores CB₁ ou por CB₂, modulando a sensação de dor por via supra-espinhal, espinhal ou mesmo por ação periférica, dependendo do tipo de modelo utilizado (Hohmann, 2002; Walker e Huang, 2002). Além do mais, embora outros analgésicos possam ser eficazes no tratamento da dor aguda, ainda se tem a necessidade de desenvolvimento de um tratamento farmacológico para as dores crônicas de origem neuropática que não são responsivas aos analgésicos comumente utilizados. Nestes casos, o uso de agonistas canabinóides para o tratamento da dor crônica tem sido fortemente recomendado por diversas pesquisas clínicas (Schnelle *et al.*, 1999; Walker e Huang, 2002). Contudo, historicamente o desenvolvimento de agonistas canabinóides para o tratamento da dor esbarra na exigência de altas doses e no conseqüente aparecimento de efeitos adversos psicotrópicos provocados por sua ação central. Por isso, mais atenção tem sido dada ao desenvolvimento de

analgésicos de ação periférica utilizando o sistema canabinóide como alvo farmacológico (Baker *et al.*, 2003). Da mesma forma, sugere-se que agonistas canabinóides de ação periférica possam ser úteis para o tratamento da asma, agindo como broncodilatadores, e para o tratamento do glaucoma, como redutores da pressão intraocular (Calignano *et al.*, 2000; Jarvinen *et al.*, 2002).

Uma outra expectativa bastante grande em relação aos canabinóides é de que eles possam ser capazes de aliviar os espasmos dolorosos e a rigidez muscular que acompanham o surgimento da esclerose múltipla (Consroe *et al.*, 1997). Em um modelo experimental de esclerose múltipla foram descobertas evidências de um controle tônico exercido pelos canabinóides sobre a rigidez muscular e os tremores musculares relacionado à ativação de receptores CB₁ (Baker *et al.*, 2000). A ação antiemética de agonistas canabinóides é também bastante conhecida e pesquisas clínicas tem demonstrado que o Δ^9 -THC pode ser útil para evitar os efeitos indesejáveis de náuseas e ânsia de vômito decorrentes da utilização de quimioterápicos para o tratamento do câncer (Lucas e Laszlo, 1980; Tramer *et al.*, 2001; Carlini, 2004). Um outro aspecto que vem ganhando relevância na indicação clínica do uso de canabinóides refere-se à regulação do apetite promovida por este sistema. O Δ^9 -THC se mostrou eficaz em melhorar o apetite de pacientes com anorexia associada à síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e levando a uma conseqüente melhora no estado nutricional geral destes pacientes (Struwe *et al.*, 1993). De modo contrário, o bloqueio dos receptores canabinóides CB₁ por um antagonista seletivo destes receptores, o SR141716A (ultimamente denominado rimonabant) se mostrou eficaz em reduzir

o peso tanto em animais obesos quanto em pacientes com obesidade e dislipidemia (Colombo *et al.*, 1998; Despres *et al.*, 2005). Recentemente o Δ^9 -THC (ou dronabinol) foi o primeiro composto com mecanismo de ação canabinóide aprovado pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), o órgão de regulamentação para novos fármacos nos EUA, e vem sendo comercializado sob o nome fantasia de Marinol® e indicado como estimulante do apetite para pacientes portadores de SIDA e para náuseas e ânsia de vômito decorrentes da quimioterapia do câncer para pacientes que não respondem aos anti-eméticos convencionais (Solvay-Pharmaceuticals, 2006). O medicamento Acomplia®, contendo o antagonista rimonabant, ainda está em fase de avaliação, tendo recentemente completado com sucesso a Fase III dos estudos clínicos necessários à sua aprovação pelo FDA. Atualmente já se vislumbra a possibilidade de sua utilização em terapias de redução de peso na obesidade e provavelmente também na diminuição do consumo de cigarros relacionado à dependência por nicotina (Wadman, 2005).

Novas potencialidades para o sistema canabinóide incluem a neuroproteção, que embora seja uma linha de pesquisa relativamente recente, tem avançando rapidamente e com resultados surpreendentes. Estudos pré-clínicos demonstraram a eficácia de agonistas canabinóides na isquemia cerebral, na epilepsia e também em modelos animais da doença de Parkinson e outras formas de doenças neurodegenerativas (Carlini, 2004; Makriyannis *et al.*, 2005). Evidências recentes demonstram que os endocanabinóides podem vir a ser utilizados como alvo farmacológico para a prevenção de prejuízos cognitivos

geralmente associados ao envelhecimento (Bilkei-Gorzo *et al.*, 2005) ou de portadores da doença de Alzheimer (Mazzola *et al.*, 2003). Além disso, estudos utilizando modelos animais sugerem um importante papel dos endocanabinóides na modulação de processos de aprendizado e memória (Terranova *et al.*, 1996; Lichtman, 2000; Takahashi *et al.*, 2005) e que a manipulação farmacológica deste sistema pode contribuir na busca de uma terapêutica para patologias com sintomas de ordem cognitivo-emocional, como depressão (Hill e Gorzalka, 2005b; 2005a) e distúrbios de ansiedade relacionados à recordação de eventos traumáticos, como fobias específicas ou o estresse pós-traumático (Marsicano *et al.*, 2002; Chhatwal *et al.*, 2005).

1.4 - COMPORTAMENTO DEFENSIVO, MEMÓRIAS AVERSIVAS E OS MODELOS ANIMAIS DE CONDICIONAMENTO AVERSIVO

As respostas emocionais a situações aversivas, constrangedoras ou ameaçadoras são bastante comuns em seres humanos e possuem grande importância para os indivíduos. No entanto, em certos momentos elas podem se tornar exageradas ou começarem a ocorrer em situações inapropriadas, caracterizando um distúrbio de ansiedade (Ledoux, 1998). Diversas similaridades relacionam os sintomas de ansiedade em seres humanos à expressão de comportamentos defensivos em animais, já que assim como os humanos, os animais tendem a apresentar comportamentos defensivos evidentes em situações potencialmente ameaçadoras (Borsini *et al.*, 2002). Esta similaridade de resposta comportamental tem sido utilizada na tentativa de se desenvolver modelos

refinados de comportamento animal que possam ser utilizados no estudo de potenciais fármacos para as patologias ligadas à ansiedade. Segundo Gray e McNaughton (2000), a ansiedade pode ser definida como a resposta defensiva em relação à presença potencial de uma ameaça. Esta definição será útil para a compreensão da importância de dois dos modelos animais mais populares no estudo de comportamentos defensivos inatos e condicionados, respectivamente o labirinto em cruz elevado (LCE) e os modelos de condicionamento aversivo (CA).

O LCE consiste num aparato com áreas abertas (expostas) e fechadas (protegidas) que pode ser explorado livremente pelo animal. Consistente com a ideia de que lugares abertos provocam reações comportamentais semelhantes à ansiedade em animais, ratos expostos ao LCE tendem a entrar menos vezes e permanecer menos tempo nas áreas expostas do labirinto em comparação às áreas protegidas. Estas medidas comportamentais no LCE foram validadas farmacologicamente, etologicamente e fisiologicamente. Primeiro, a administração de benzodiazepínicos, ansiolíticos clássicos, aumenta o número de entradas e o tempo de permanência nas áreas abertas do LCE, enquanto manipulações ansiogênicas tendem a reduzir estes parâmetros (Pellow *et al.*, 1985; Pellow e File, 1986; Carobrez e Bertoglio, 2005). Segundo, a análise etológica de uma sessão experimental demonstra que os animais expostos ao LCE tendem a expressar comportamentos defensivos principalmente nas áreas expostas do labirinto (Pellow *et al.*, 1985; Pellow e File, 1986; Cruz *et al.*, 1994). Por último, animais confinados às áreas abertas do LCE produzem maiores concentrações de corticosterona (resposta emocional endócrina) e bolos fecais (resposta emocional autonômica) comparados aos animais confinados às áreas protegidas do labirinto

(Pellow *et al.*, 1985). O LCE também pode ser utilizado para se avaliar a ansiogênese causada pela recordação de experiências aversivas em uma modificação experimental conhecida como LCE potencializado pelo medo (Mechiel Korte e De Boer, 2003). Já os modelos animais de CA tem sido utilizados para o estudo de memórias aversivas e da expressão de comportamentos defensivos que sucedem a recordação destas memórias, principalmente considerando que uma etapa inicial de aquisição de comportamentos defensivos condicionados esteja envolvida no desenvolvimento de patologias de ansiedade deflagradas pela exposição a experiências traumáticas (Brewin e Holmes, 2003). Estas similaridades entre os mecanismos de aquisição e expressão do medo condicionado e as já citadas patologias de ansiedade tornam o estudo dos modelos animais de condicionamento aversivo de grande importância para o entendimento dos mecanismos biológicos inerentes às memórias emocionais e para o desenvolvimento de terapias farmacológicas para estas patologias (Pare *et al.*, 2004)

Basicamente, um modelo animal de CA implica no aprendizado de que certos estímulos ambientais (pistas cognitivas) antecipam eventos aversivos. Um estímulo condicionado (EC), inicialmente neutro e incapaz de provocar reação comportamental explícita, adquire a capacidade de provocar reações comportamentais após a associação a um estímulo incondicionado (EI) aversivo. Assim que a associação EC-EI é aprendida, reações comportamentais e fisiológicas inatas em respostas a estímulos ameaçadores são expressos na presença do EC. Estas respostas incluem comportamentos defensivos, como o congelamento e a esquiva, respostas autonômicas, como aumento da pressão

arterial e frequência cardíaca, bem como alterações endócrinas, como a liberação de corticotrofina. Além disso, observam-se alterações na sensibilidade à dor (analgesia) e expressão de comportamentos reflexos, como o sobressalto e piscar de olhos. Estas respostas comportamentais e fisiológicas podem ser estabelecidas com apenas um pareamento EC-EI formando invariavelmente uma memória de longa duração (Yaniv *et al.*, 2004).

Existem pelo menos dois tipos de modelos de CA, cada um representando aspectos distintos da formação de memórias aversivas. O condicionamento aversivo auditivo é realizado quando o EC associado ao EI se trata de um som, ou seja, um estímulo unimodal, bem definido e explícito. O condicionamento aversivo contextual é realizado com a associação do EI a estímulos variados, de múltiplas modalidades sensoriais e que requerem a sua integração em uma representação única do ambiente, denominada de contexto, tratando-se de um EC muito mais complexo do que uma simples associação som-EI (Yaniv *et al.*, 2004). Um modelo de CA, como qualquer modelo animal de aprendizado e memória, possui diversas etapas relacionadas aos processos mnemônicos de aquisição, consolidação, evocação e extinção ou reconsolidação, todas passíveis de manipulação farmacológica e com grande importância biológica.

A aquisição é a etapa inicial do processo de formação da memória e se refere ao momento em que a associação EC-EI se concretiza. Imediatamente após, inicia-se o processo de consolidação que envolve uma série de processos metabólicos em estruturas cerebrais especializadas visando à estabilização e armazenamento da memória em uma memória de longa duração (Izquierdo e Medina, 1997). A aquisição e consolidação, no condicionamento aversivo, são

dependentes de uma estrutura cerebral chamada de amígdala que está amplamente envolvida no processamento de informações emocionais (Kim e Fanselow, 1992; Phillips e Ledoux, 1992). A lesão da amígdala, por exemplo, resulta em prejuízo da aquisição/consolidação de ambas as modalidades de condicionamentos aversivos (Kim e Fanselow, 1992; Phillips e Ledoux, 1992). Estudos de lesão também demonstraram a grande importância do hipocampo para a aquisição/consolidação do condicionamento aversivo contextual, no qual se supõe que o hipocampo seja responsável pela configuração dos diversos estímulos sensoriais em uma representação unificada do contexto, que seria associado ao componente aversivo sinalizado pela amígdala (Kim e Fanselow, 1992; Phillips e Ledoux, 1992; Maren, 2001). Já o condicionamento aversivo auditivo parece ser independente do hipocampo, embora seja intrinsecamente dependente de outras estruturas cerebrais como o estriado (Ferreira *et al.*, 2003). A etapa de evocação, essencial para a quantificação da memória nos modelos animais, se dá com a exposição do animal ao EC, momento em que este apresentará os comportamentos defensivos anteriormente associados com a apresentação do EI (Cammarota *et al.*, 2005). No momento da evocação do CA as memórias latentes se tornam lábeis, podendo ser extintas (Izquierdo *et al.*, 1965), reconsolidadas (Nader *et al.*, 2000; Nader, 2003), ou ainda podem incorporar novas informações de natureza cognitiva (Loftus e Palmer, 1974) ou neurohumoral (Izquierdo *et al.*, 1989). Se a informação contida na memória (associação EC-EI) continua sendo importante biologicamente para o indivíduo, esta é reforçada e o animal continua expressando comportamentos defensivos em resposta à apresentação do EC, um fenômeno conhecido como

reconsolidação; ou então, se a associação EC-EI deixa de ser relevante biologicamente para o indivíduo (em geral pela perda do componente aversivo - EI), o animal passa a deixar de expressar comportamentos defensivos em resposta à apresentação do EC, um fenômeno conhecido como extinção e considerado como resultado de uma nova associação EC – “ausência de EI” , que se sobrepõe à associação EC-EI inicialmente realizada (Cammara *et al.*, 2005). Diversos fatores se equilibram para determinar se uma memória será reconsolidada ou extinta, sendo de crucial importância o tempo de exposição do EC durante o teste de evocação (Suzuki *et al.*, 2004). Além da amígdala e do hipocampo, importantes também para a aquisição do CA, uma das estruturas cerebrais envolvidas nesta etapa de reorganização da resposta defensiva ao EC é o córtex pré-frontal (Milad e Quirk, 2002). Bioquimicamente se sabe que o processo de consolidação das memórias aversivas envolve diversos componentes como a síntese de novas proteínas, AMPc e etapas de fosforilação de proteínas quinases (Schafe *et al.*, 2001). Por outro lado, recentemente se sabe que proteínas fosfatases, assim como a síntese de novas proteínas participam do processo de extinção do CA (Nader *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2003a; Lin *et al.*, 2003b). Na última década começaram a surgir evidências relacionando processos de plasticidade sináptica elétrica conhecidos como potenciação de longo prazo (LTP) e depressão de longo prazo (LTD) aos mecanismos endógenos de memória (Maren, 2001). Além disso, os mecanismos de memória parecem ter uma relação com o número de espinhas dendríticas e números de sinapses formadas entre neurônios de determinadas áreas cerebrais (Toni *et al.*, 1999; Segal e Andersen, 2000) e possivelmente com alterações na densidade de

receptores expressos na fenda sináptica dos neurônios destas regiões (Malinow, 2003; Takahashi *et al.*, 2003). Importante salientar que há evidências contundentes de que estes processos bioquímicos, eletrofisiológicos e estruturais de plasticidade sináptica citados anteriormente podem ser modulados pela manipulação do sistema canabinóide de neurotransmissão, interferindo com os processos de aprendizado e memória (Sullivan, 2000; Kim e Thayer, 2001; Cannich *et al.*, 2004).

Classicamente se sabe que a administração sistêmica aguda de agonistas canabinóides prejudica e em certos casos impede a formação de diversos tipos de memórias em modelos animais (Lichtman *et al.*, 1995; Ferrari *et al.*, 1999; Sullivan, 2000; Da Silva e Takahashi, 2002; Davies *et al.*, 2002; Egashira *et al.*, 2002; Rodriguez De Fonseca *et al.*, 2005). De maneira oposta, a administração sistêmica aguda de antagonistas canabinóides parece melhorar os processos de aquisição e consolidação (Varvel e Lichtman, 2002; Wolff e Leander, 2003; Takahashi *et al.*, 2005). No entanto, pouco se sabe a respeito da influência da manipulação deste sistema de neurotransmissão sobre memórias aversivas e, especialmente, pouquíssimos experimentos foram realizados utilizando modelos animais de condicionamento aversivo. Recentemente, evidências com animais *knock-out* e com o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 demonstraram a intensa participação destes receptores e da liberação de mediadores canabinóides endógenos no processo de extinção de memórias aversivas em modelos animais de condicionamento aversivo, ressaltando certamente a importância do estudo da influência do sistema canabinóide sobre estas memórias (Marsicano *et al.*, 2002). Neste sentido, os efeitos da administração

sistêmica aguda de compostos exógenos que agem no sistema canabinóide serão avaliados tendo em vista que uma manipulação farmacológica que seja bem sucedida em prejudicar as etapas de formação de memórias aversivas ou que seja capaz de facilitar o processo de extinção destas memórias poderia contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos neurobiológicos subjacentes aos distúrbios de ansiedade envolvendo a recordação de memórias aversivas. Além disso, serão analisados os efeitos destes compostos em memórias aversivas antigas, em um modelo animal de extinção de memória associativa espacial (tarefa reversa do labirinto aquático) e em um modelo animal de aversão inata (LCE potencializado pelo medo), visando a uma maior caracterização comportamental da influência da manipulação do sistema canabinóide na expressão de comportamentos envolvendo componentes cognitivos e emocionais.

2 - OBJETIVO

Caracterizar os efeitos agudos sistêmicos da administração de um agonista canabinóide e de um antagonista canabinóide sobre as etapas de aquisição, consolidação, evocação e extinção de memórias aversivas utilizando modelos animais de condicionamento aversivo.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 na etapa de aquisição do condicionamento aversivo contextual em ratos.

Avaliar os efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 na etapa de consolidação do condicionamento aversivo contextual em ratos.

Avaliar os efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 na etapa de evocação do condicionamento aversivo contextual em ratos.

Avaliar os efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 na etapa de extinção do condicionamento aversivo contextual em ratos.

Comparar a capacidade do agonista canabinóide WIN55212-2 em influenciar a aquisição do condicionamento aversivo auditivo e contextual em ratos.

Comparar a capacidade do agonista canabinóide WIN55212-2 em influenciar a extinção de memórias recentes (1 dia) e antigas (30 dias) no condicionamento aversivo contextual em ratos.

Caracterizar os resultados obtidos nos experimentos de condicionamento aversivo, descartando eventuais efeitos locomotores, de aprendizado dependente de estado e de comportamentos defensivos inatos.

Avaliar os efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 na tarefa reversa do labirinto aquático em ratos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando aproximadamente 350 g e com cerca de 3 meses de idade na data de experimentação. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos por pelo menos uma semana antes dos experimentos no biotério do Laboratório de Psicofarmacologia para aclimação. Os animais foram agrupados em caixas de polipropileno (42 x 34 x 17 cm), contendo 5 ou 6 animais por caixa e mantidos em condições controladas de umidade e temperatura (23 ± 2 °C), com ciclo claro-escuro de 12 horas (fase clara das 7:00 às 19:00 h), com água e ração providas *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram conduzidos cuidadosamente de acordo com as normas do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC).

3.2 – DROGAS

WIN55212-2 (WIN, Tocris) e SR147778 (SR, Sanofi-Synthelabo) foram dissolvidos em solução fisiológica (NaCl 0,9%) contendo 10% de dimetilsufóxido (DMSO) e 0,1% de Tween 80. O veículo de dissolução foi utilizado como solução

controle. Ambas as drogas ou solução controle foram administradas intraperitonealmente (i.p.) em um volume de 0,2 ml / 100 g de peso corporal.

3.3 – PROCEDIMENTOS

Todos os experimentos comportamentais descritos a seguir foram registrados com a utilização de um sistema de vídeo-câmera, permitindo ao experimentador observar os animais por um monitor de vídeo posicionado em uma sala adjacente à sala do experimento.

3.3.1 – Condicionamento Aversivo

Os experimentos de condicionamento aversivo foram realizados em uma caixa de esquiva ativa (Ugo Basile) dotada de chão gradeado conectado a um gerador de choques elétricos e gerador de som de frequência e amplitude ajustáveis, devidamente adaptados às condições experimentais. O mesmo compartimento da gaiola de condicionamento (22 x 22 x 25 cm) foi utilizado em todos os procedimentos experimentais. A sala de experimentação foi suavemente iluminada por uma luz vermelha, resultando em uma luminosidade ambiental de cerca de 10 Lux. Duas versões de condicionamento aversivo foram utilizadas, o condicionamento aversivo contextual e o condicionamento aversivo auditivo, ambos adaptados do método previamente proposto por Schafe e Ledoux (2000).

3.3.1.1 – Condicionamento aversivo contextual

No condicionamento aversivo (CA) contextual os animais foram colocados na gaiola de condicionamento e após 3 min receberam um choque elétrico nas patas de curta duração e intensidade moderada (1 s, 1,5 mA). Os animais permaneceram por mais 1 min na gaiola de condicionamento antes de serem retirados e levados novamente ao biotério. O teste comportamental neste modelo consistiu em reexpor por 3 min o animal à gaiola onde fora previamente condicionado. Nesta situação, os animais expressam respostas autonômicas e comportamentos defensivos bastante claros, como congelamento, piloereção, aumento da frequência cardíaca e liberação de corticotrofina (Blanchard e Blanchard, 1969; Fanselow, 1980; Ledoux, 1993). No presente estudo, o congelamento, definido por Blanchard e Blanchard (1969) como imobilidade em uma posição estereotipada de agachamento, com exceção dos movimentos necessários para a respiração, e caracterizado como um comportamento condicionado por Fanselow (1980), foi registrado e utilizado como índice de memória. Experimentos diferentes foram realizados utilizando o condicionamento aversivo contextual como modelo comportamental.

No experimento 1 (aquisição), os animais foram injetados i.p. com WIN (0,25; 1,25; 2,5; 5,0 mg/kg) ou solução controle e 30 min após foram submetidos ao procedimento de CA contextual. Um outro grupo de animais foi injetado i.p. com SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg) ou solução controle e após 20 min foi submetido ao condicionamento. Vinte e quatro horas após, os animais foram reexpostos à gaiola de condicionamento e o comportamento de congelamento foi registrado por 3 min.

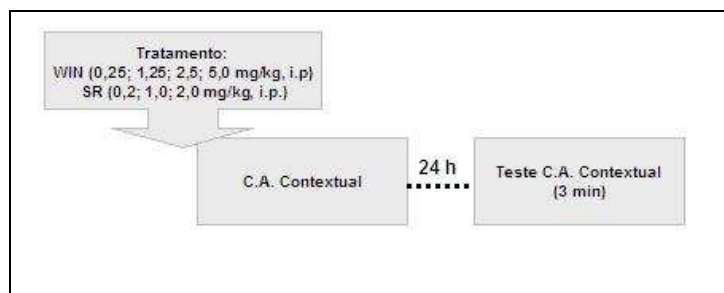


Figura 4 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual.

No experimento 2 (consolidação), os animais foram submetidos ao procedimento de CA contextual e imediatamente após serem retirados de gaiola de condicionamento foram injetados i.p. com WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg), SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg) ou solução controle e retornaram às respectivas caixas de moradia. Vinte e quatro horas após, os animais foram reexpostos à gaiola de condicionamento e o comportamento de congelamento foi registrado por 3 min.

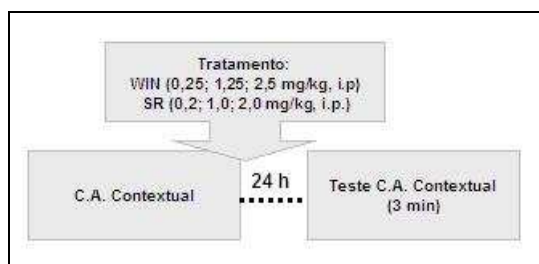


Figura 5 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 sobre a consolidação do condicionamento aversivo contextual.

No experimento 3 (evocação), os animais foram primeiramente submetidos ao procedimento de CA contextual. Vinte e quatro horas depois, foram injetados

i.p. com WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg) ou solução controle e 30 min após reexpostos à gaiola de condicionamento para terem o comportamento de congelamento registrado por 3 min. Um outro grupo experimental foi igualmente submetido ao procedimento de CA contextual e 24 h depois injetados i.p. com SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg) ou solução controle e 20 min após reexpostos à gaiola de condicionamento para terem o comportamento de congelamento registrado por 3 min.

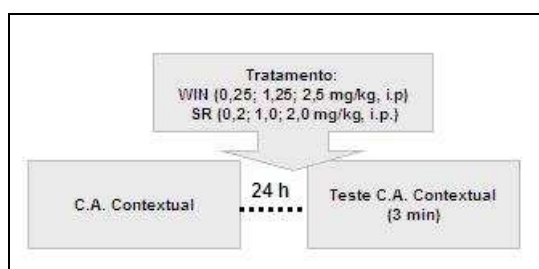


Figura 6 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 sobre a evocação do condicionamento aversivo contextual.

No experimento 4 (extinção), os animais foram submetidos ao procedimento de CA contextual e 24 h após os animais foram submetidos a 3 sessões consecutivas de extinção do condicionamento aversivo, com 24 h de intervalo entre elas. Em cada sessão, os animais foram expostos à gaiola de condicionamento por 9 min e o comportamento de congelamento foi avaliado e registrado em blocos de 3 min. Um grupo de animais foi injetado i.p. com WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg) ou solução controle 30 min antes de cada sessão de extinção e outro grupo de animais foi injetado i.p. com SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg) ou solução controle 20 min antes de cada sessão de extinção.

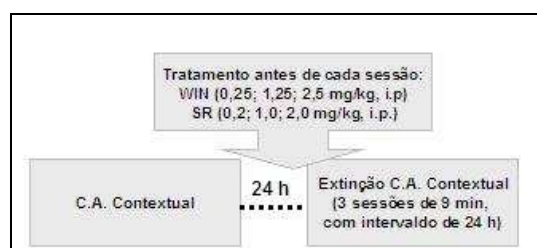


Figura 7 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual.

3.3.1.2 – Condicionamento aversivo auditivo

No CA auditivo, os animais foram colocados na gaiola de condicionamento e após 3 min foi emitido um som (1000 Hz, 80 dB) por 10 s, que terminou ao mesmo tempo em que os animais receberam um choque elétrico nas patas de curta duração e intensidade moderada (1 s, 1,5 mA). Vinte e quatro horas após serem condicionados ao som, os animais foram colocados em um novo ambiente (caixas de acrílico transparente de 30 x 30 x 30 cm) e um som idêntico ao utilizado para o condicionamento é emitido em três pulsos de 1 min, com intervalo de 1 min entre eles. O comportamento de congelamento expresso durante a emissão do som foi registrado e utilizado como índice de memória.

Apenas o experimento de aquisição foi realizado para o CA auditivo. Neste, os animais foram injetados i.p. com WIN (0,25; 1,25; 2,5; 5,0 mg/kg) ou solução controle e 30 min depois submetidos ao procedimento de CA auditivo. Vinte e quatro horas após os animais foram reexpostos ao som, conforme descrição acima.

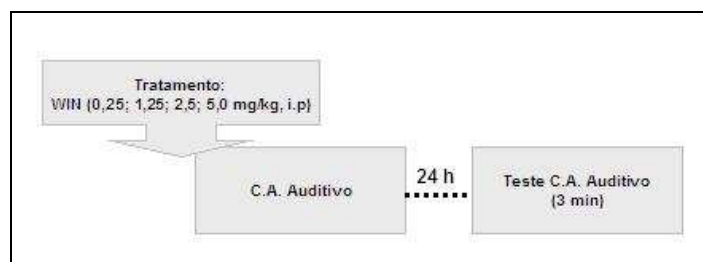


Figura 8 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a aquisição do condicionamento aversivo auditivo.

3.3.1.3 – Participação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual

A menor dose efetiva de WIN foi selecionada para se estudar a participação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos desta droga sobre a aquisição do CA contextual. Para isto, os animais foram injetados i.p. com SR (1,0 mg/kg) ou solução controle e 20 min depois receberam mais uma injeção i.p. de WIN (2,5 mg/kg) ou solução controle, resultando em 4 grupos experimentais. Trinta minutos após a administração de WIN ou solução controle os animais foram submetidos ao processo de CA contextual conforme descrição anterior. Vinte e quatro horas depois, os animais foram reexpostos à gaiola de condicionamento e o comportamento de congelamento foi avaliado durante 3 min.

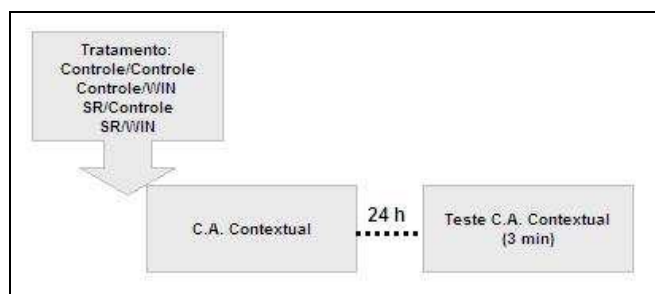


Figura 9 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação da participação de receptores CB1 nos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual.

3.3.1.4 - Avaliação de aprendizado dependente de estado no condicionamento aversivo contextual

A menor dose efetiva de WIN foi selecionada para verificar se os efeitos desta droga na aquisição do CA contextual poderiam ser resultantes de um aprendizado dependente de estado. Para isto, grupos separados de animais foram administrados i.p. com WIN (2,5 mg/kg) ou solução controle e 30 min depois submetidos ao procedimento de CA contextual. Vinte e quatro horas após, metade dos animais de cada grupo foi administrado i.p. com WIN (2,5 mg/kg) e a outra metade com solução controle e 30 min depois os animais foram reexpostos à gaiola de condicionamento para avaliação do comportamento de congelamento por 3 min. Este procedimento resultou em 4 grupos experimentais conforme descrição na tabela abaixo:

Tabela 1 – Grupos experimentais da avaliação de aprendizado dependente de estado no condicionamento aversivo contextual.

<i>Grupo Experimental</i>	<i>Tratamento pré-condicionamento</i>	<i>Tratamento pré-teste</i>	<i>n</i>
C-C	Solução controle	Solução controle	6
C-W	Solução controle	WIN55212-2	7
W-C	WIN55212-2	Solução controle	6
W-W	WIN55212-2	WIN55212-2	6

3.3.1.5 – Participação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a extinção de memórias aversivas antigas

No experimento de extinção de memórias aversivas antigas, os animais foram primeiramente submetidos simultaneamente ao processo de CA auditivo e contextual. Trinta dias após o condicionamento os animais foram submetidos a 5 sessões de extinção do CA contextual, cada uma com 9 min de duração e com intervalo de 24 h entre elas, durante as quais o comportamento de congelamento foi avaliado e registrado em blocos de 3 min. A fim de se verificar os efeitos do agonista canabinóide WIN sobre a extinção de memórias aversivas antigas e se este efeito estaria relacionado à ativação de receptores canabinóides CB₁, uma dose de WIN e uma de SR foram selecionadas a partir dos experimentos anteriores. Dois grupos de animais receberam uma administração i.p. de WIN (0,25 mg/kg) e um grupo recebeu uma administração i.p. de solução controle 30 min antes de cada sessão de extinção. Um dos grupos foi administrado i.p. com SR (0,2 mg/kg) 20 min previamente à administração de WIN, enquanto os outros

dois grupos foram administrados com solução controle. Vinte e quatro horas após o término das 5 sessões de extinção do CA contextual os animais foram testados para evocação do CA auditivo na ausência de qualquer tratamento farmacológico. Para isto, os animais foram expostos a um novo ambiente (caixas de acrílico transparente de 30 x 30 x 30 cm) e um som idêntico ao utilizado para o condicionamento foi emitido em três pulsos de 1 min, com intervalo de 1 min entre eles. O comportamento de congelamento expresso durante a emissão do som foi registrado e utilizado como índice de memória. Para avaliar se os efeitos do tratamento com WIN são persistentes, os animais foram novamente reexpostos à gaiola de condicionamento por 3 min, 24 h após o teste do CA auditivo, e na ausência de qualquer tratamento farmacológico. A ilustração abaixo (Figura 10) esquematiza o procedimento realizado.

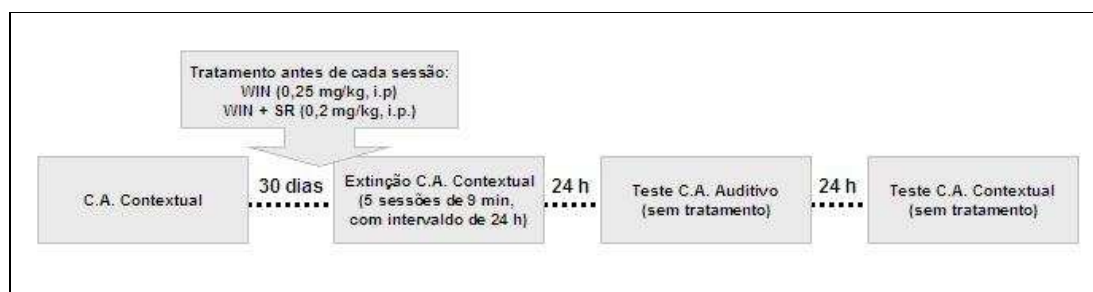


Figura 10 – Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação da participação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a extinção de memórias aversivas antigas.

3.3.2 – Avaliação Motora

Para avaliarmos possíveis alterações motoras provocadas pelo tratamento com WIN, os animais foram testados por 3 min no campo aberto. O campo aberto foi confeccionado em madeira, pintado de cor branca, com um assoalho (100 x 100 cm), dividido em 25 quadrantes (20 x 20 cm) delimitado lateralmente por paredes igualmente brancas de 40 cm de altura. Os animais foram administrados i.p. com WIN (0,25; 1,25; 2,5; 5,0 mg/kg) ou solução controle e 30 min depois colocados no quadrante central do campo aberto para avaliação do número de quadrantes cruzados como índice de atividade locomotora.

3.3.3 – Labirinto em Cruz Elevado Potencializado pelo Medo

A fim de se verificar os efeitos do tratamento com WIN sobre a ansiedade provocada pela recordação de memórias aversivas, os animais foram avaliados no modelo do labirinto em cruz elevado (LCE) potencializado pelo medo, previamente descrito por Korte et al (1999). O LCE foi confeccionado em madeira e coberto por uma camada de fórmica preta. O aparato é constituído por 4 braços com 50 cm de comprimento, 10 cm de largura e posicionados a 50 cm de altura. Dois braços opostos são protegidos por paredes de 40 cm de altura e são chamados de braços fechados, os outros dois possuem apenas uma pequena proteção de 2,5 cm e são chamados de braços abertos. Os quatro braços são conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). A sala de experimento foi levemente iluminada

por uma luz vermelha, resultando em uma luminosidade ambiental de cerca de 10 Lux. Os animais foram colocados na gaiola de condicionamento e submetidos ao CA contextual como descrito anteriormente. Vinte quatro horas depois, um grupo de animais foi reexposto à gaiola de condicionamento por 3 min e imediatamente após avaliado no LCE (grupo condicionado). Outro grupo de animais foi avaliado no LCE 24 h após ter recebido um choque nas patas dentro da gaiola de condicionamento, sem no entanto haver reexposição (grupo choque). Um grupo adicional foi exposto à gaiola de condicionamento, sem receber choque nas patas, e 24 h depois foi reexposto à gaiola de condicionamento por 3 min e imediatamente após avaliado no LCE (grupo naive). Os animais foram administrados i.p. com WIN (0,25 mg/kg) ou solução controle 30 min antes de serem colocados na plataforma central do labirinto em cruz elevado, voltados para um dos braços abertos, a fim de serem avaliados por um período de 5 min. O tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos foram utilizados como índice de comportamento tipo ansiedade e o número de entradas nos braços fechados foi utilizado como índice de locomoção geral (Cruz *et al.*, 1994).

Tabela 2 – Grupos experimentais da avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 no labirinto em cruz elevado potencializado pelo medo.

<i>Grupo Experimental</i>	<i>Tratamento</i>	<i>n</i>
Naive	Solução Controle	9
Naive	WIN55212-2	9
Condicionado	Solução Controle	9
Condicionado	WIN55212-2	9
Choque	Solução Controle	8
Choque	WIN55212-2	8

3.3.4 – Tarefa Reversa do Labirinto Aquático

Para testar se os efeitos da manipulação do sistema canabinóide sobre a extinção do condicionamento aversivo poderiam ser generalizados para outra tarefa com diferentes características motivacionais, os animais foram testados na tarefa reversa do labirinto aquático segundo metodologia previamente descrita por Varvel e Lichtman (2002). O labirinto aquático consistiu em um tanque circular de cor preta (1,7 m de diâmetro e 80 cm de altura), confeccionado com base na descrição pioneira de Morris et al. (1984) e posicionado no interior de uma sala cujas paredes continham pistas visuais. O tanque foi preenchido com água até a altura de 60 cm, com temperatura controlada de 25 ± 2 °C por um sistema automatizado de resistências controladas por um termostato. Foram estabelecidas 4 posições de partida (norte, sul, leste e oeste) que dividiram a superfície do labirinto em 4 quadrantes de igual tamanho. Uma plataforma de acrílico transparente (10 x 10 cm) foi submersa a cerca de 1,5 cm abaixo da superfície da água e posicionada no centro do quadrante nordeste a 35 cm das paredes do labirinto. Os animais foram submetidos a 2 dias consecutivos de treino, cada qual constituído de 6 sessões, durante as quais a plataforma permaneceu na mesma posição. Em cada sessão, os animais eram colocados na água a partir de um dos pontos de partida citados, com a face voltada para a parede do labirinto, e deixado à vontade para nadar até a plataforma. Caso o animal não encontrasse a plataforma até um tempo limite de 60 s, ele seria cuidadosamente guiado até ela. Ao encontrá-la, o animal era deixado por 10 s sobre a plataforma e depois deste

tempo era retirado por 20 s do labirinto antes de ser colocado no próximo ponto de partida. Vinte e quatro horas depois da última sessão de treino, os animais foram injetados i.p. com WIN (0,25 mg/kg), SR (1,0 mg/kg) ou solução controle e submetidos a uma tarefa reversa, na qual a posição da plataforma havia sido trocada para o quadrante diametralmente oposto (centro do quadrante sudoeste). Os pontos de partida e os intervalos entre os testes foram idênticos aos anteriormente descritos. O tempo necessário ao animal para encontrar a plataforma submersa (latência) foi registrado e utilizado como parâmetro de aprendizado e memória em ambas as sessões de treino e tarefa reversa.



Figura 11 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado no protocolo de avaliação dos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 sobre o desempenho de animais na tarefa reversa do labirinto aquático.

3.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os experimentos de aquisição, consolidação e evocação do condicionamento aversivo, assim como o experimento do campo aberto foram analisados por análise de variância de uma via, utilizando o fator tratamento como variável independente. O experimento do labirinto em cruz elevado potencializado pelo

medo foi analisado por análise de variância de duas vias, tendo os fatores grupo e tratamento como variáveis independentes. Os experimentos de extinção do condicionamento aversivo e de tarefa reversa do labirinto aquático foram analisados por ANOVA de 2 vias, com tratamento e sessões (medida repetida) como variáveis independentes. Posteriormente à ANOVA, os grupos foram comparados entre si utilizando o teste post-hoc de Duncan. O nível de significância considerado para todos os testes foi $p < 0,05$. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico *Statistica 6.0*[®].

4 – RESULTADOS

4.1 – CONDICIONAMENTO AVERSIVO

Inicialmente, realizou-se a padronização dos modelos de CA contextual e auditivo. Como descrito na Introdução, o princípio do condicionamento aversivo é a associação de um estímulo aversivo incondicionado (EI), geralmente doloroso, a um estímulo inócuo, chamado de estímulo condicionado (EC). A apresentação do EC após a associação com o EI provoca reações comportamentais defensivas no animal, similares às provocadas originalmente pela apresentação do EI. No CA contextual, o EC é o ambiente onde o animal foi condicionado (a gaiola de condicionamento), com suas pistas cognitivas de múltiplas características sensoriais, enquanto que no CA auditivo, o EC é um som de baixa intensidade, considerado um estímulo unimodal. Para ambos, o EI utilizado foi um choque elétrico nas patas, gerado no chão gradeado da gaiola de condicionamento.

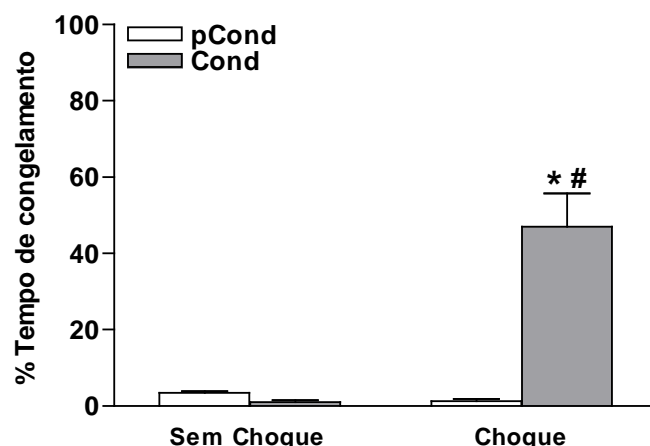


Figura 12 – Padronização do condicionamento aversivo contextual. Os animais foram expostos à gaiola de condicionamento e receberam ou não um choque nas patas, sendo 24 h após re-expostos à gaiola de condicionamento por 3 min. Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais durante o pré-condicionamento (pCond) ou após o condicionamento (Cond). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo pCond. # $p < 0,05$ comparado ao grupo “Sem Choque” na mesma sessão. (Sem Choque/ $n=7$, Choque/ $n=7$).

A figura 12 ilustra a padronização do CA contextual. A ANOVA de 2 vias revelou efeito para grupo [$F(1,24)=25,35$; $p=0,00004$], condição [$F(1,24)=24,80$; $p=0,00004$] e para a interação entres estes dois fatores [$F(1,24)=30,96$; $p=0,00001$]. A análise post-hoc demonstrou que o grupo que recebeu o choque nas patas apresentou um comportamento condicionado de congelamento quando re-exposto à gaiola de condicionamento após a associação EC-EI, o que não aconteceu com os animais que foram somente expostos à gaiola de condicionamento, mas não receberam o choque nas patas ($p < 0,05$).

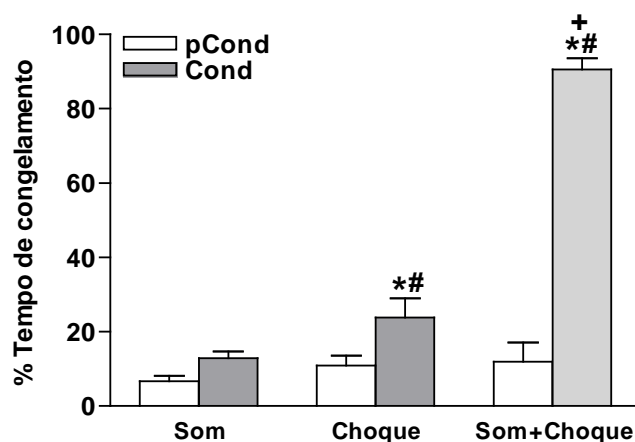


Figura 13 – Padronização do condicionamento aversivo auditivo. Os animais foram expostos à gaiola de condicionamento e receberam um som, choque ou a associação som+choque, sendo 24 h após re-expostos ao som em um novo ambiente por 3 min. Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais no pré-condicionamento (pCond) ou após o condicionamento (Cond) durante a exposição ao som. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo pCS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo “Som” na mesma sessão. + $p < 0,05$ comparado ao grupo “Choque” na mesma sessão (Som / $n=6$, Choque/ $n=7$, Som+Choque/ $n=6$).

A figura 13 ilustra a padronização do CA auditivo. A ANOVA de 2 vias revelou efeito para grupo [$F(2,32)=72,68$; $p=0,00001$], condição [$F(1,32)=123,20$; $p=0,00001$] e para a interação entre estes dois fatores [$F(2,32)=60,07$; $p=0,00001$]. A análise post-hoc demonstrou que o grupo que recebeu somente a apresentação do som (sem choque) não apresentou um aumento no tempo de congelamento quando o som foi re-apresentado em um novo ambiente. Por outro lado, o grupo que recebeu somente o choque nas patas apresentou um aumento no tempo de congelamento em resposta à apresentação do som ($p < 0,05$), refletindo provavelmente uma sensibilização à resposta provocada pelo estímulo sonoro. Já o grupo que recebeu o choque nas patas conjuntamente à apresentação de som exibiu um aumento no tempo de congelamento quando o som foi re-apresentado em um novo ambiente ($p < 0,05$). Os níveis de congelamento apresentado pelo

grupo “Som+Choque” foi significativamente maior do que o do grupo “Choque” ($p<0,05$), demonstrando que o pareamento entre o som e choque (condicionamento) é capaz de provocar uma reação bastante evidente de comportamento condicionado de congelamento.

4.1.1 – Efeitos do Agonista Canabinóide WIN55212-2 e do Antagonista Canabinóide SR147778 na Aquisição do Condicionamento Aversivo Contextual

Com o intuito de se verificar os efeitos da manipulação do sistema canabinóide na aquisição de memórias aversivas, WIN (0,25; 1,25; 2,5; 5,0 mg/kg, i.p.) e SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg, i.p.) foram administrados previamente à realização do CA contextual.

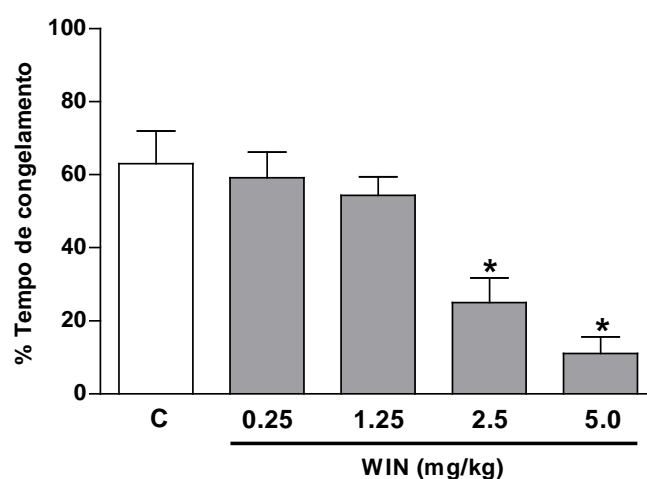


Figura 14 – Efeito da administração do agonista canabinóide WIN55212-2 (WIN) sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual. Os animais foram injetados com WIN (0,25; 1,25; 2,5; 5,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C), submetidos ao condicionamento aversivo contextual e 24 h após re-expostos à gaiola de condicionamento por 3 min. Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média ± e.p.m.) expressa pelos animais durante o teste. * $p<0,05$ comparado ao grupo controle (teste de Duncan). (Controle/n=10, WIN 0,25/n=10, WIN 1,25/n=10, WIN 2,5/n=10, WIN 5,0/n=10).

A figura 14 representa os resultados do tratamento com WIN na etapa de aquisição do CA contextual. A ANOVA de 1 via demonstrou efeito significativo para o fator tratamento [$F(4,45)=12,32$; $p=0,000001$]. A análise post-hoc revelou que este efeito ocorreu de maneira dose-dependente. Enquanto os grupos tratados com as doses mais baixas de WIN (0,25 e 1,25 mg/kg, i.p.) apresentaram níveis de tempo de congelamento semelhantes ao controle no dia do teste, os grupos tratados com as doses mais altas (2,5 e 5,0 mg/kg, i.p.) apresentaram uma redução no nível de congelamento comparado ao grupo controle ($p<0,05$), demonstrando que o tratamento com altas doses de WIN prejudica a formação da associação entre o choque e o contexto (Fig 14).

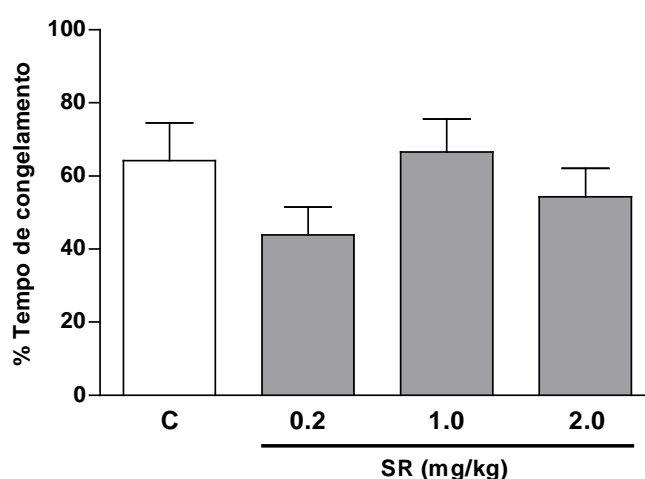


Figura 15 – Efeito da administração do antagonista canabinóide SR147778 (SR) sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual. Os animais foram injetados com SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C), submetidos ao condicionamento aversivo contextual, e 24 h depois re-expostos à gaiola de condicionamento por 3 min. Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais durante o teste. * $p<0,05$ comparado ao grupo controle (teste de Duncan). (Controle/ $n=8$, SR 0,2/ $n=7$, SR 1,0/ $n=8$, SR 2,0/ $n=8$).

A figura 15 representa os resultados do tratamento com SR na etapa de aquisição do condicionamento aversivo contextual. A ANOVA de 1 via não demonstrou diferença significativa para o fator tratamento [$F(3,27)=1,32$; $p=0,29$]. Apesar do agonista canabinóide WIN ter sido capaz de prejudicar a aquisição de memórias aversivas neste

modelo comportamental, o bloqueio dos receptores canabinóides CB1 pelo antagonista SR se mostrou incapaz de afetar a aquisição do condicionamento aversivo contextual, pelo menos nas doses utilizadas (Fig 15).

4.1.2 – Efeitos do Agonista Canabinóide WIN55212-2 e do Antagonista Canabinóide SR147778 na Consolidação do Condicionamento Aversivo Contextual

A fim de se verificar os efeitos da manipulação do sistema canabinóide na consolidação de memórias aversivas, WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg, i.p.) e SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg, i.p.) foram administrados imediatamente após a realização do condicionamento aversivo contextual.

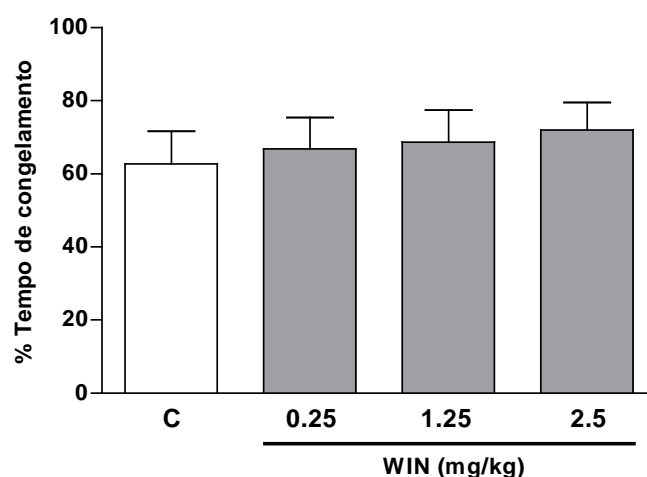


Figura 16 – Efeito da administração do agonista canabinóide WIN55212-2 (WIN) sobre a consolidação do condicionamento aversivo contextual. Os animais foram submetidos ao condicionamento aversivo contextual, imediatamente após injetados com WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C), e 24 h após re-expostos à gaiola de condicionamento por 3

min. Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais durante o teste. (Controle/n=7, WIN 0,25/n=7, WIN 1,25/n=7, WIN 2,5/n=8).

A figura 16 representa os resultados do tratamento com WIN na etapa de consolidação do condicionamento aversivo contextual. A ANOVA de 1 via não demonstrou efeito significativo para o fator tratamento [$F(3,25)=0,22$; $p=0,88$].

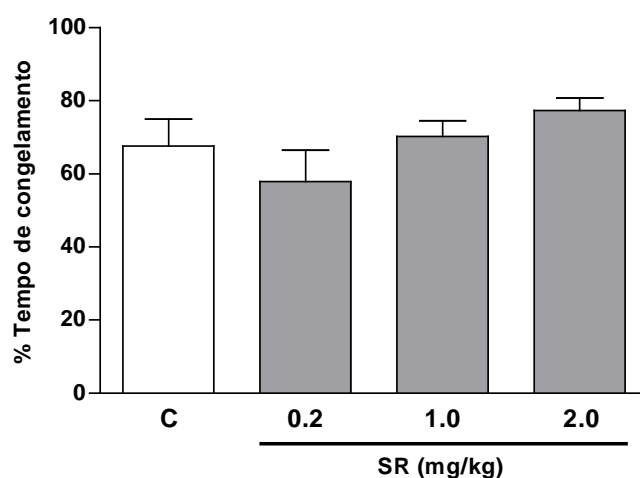


Figura 17 – Efeito da administração do antagonista canabinóide SR147778 (SR) sobre a consolidação do condicionamento aversivo contextual. Os animais foram submetidos ao condicionamento aversivo contextual, imediatamente após injetados com SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C), e 24 h após re-expostos à gaiola de condicionamento por 3 min. Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais durante o teste. (Controle/n=8, SR 0,2/n=8, SR 1,0/n=9, SR 2,0/n=8).

A figura 17 representa os resultados do tratamento com SR na etapa de consolidação do condicionamento aversivo contextual. A ANOVA de 1 via não demonstrou efeito significativo para o fator tratamento [$F(3,29)=1,65$; $p=0,20$].

4.1.3 – Efeitos do Agonista Canabinóide WIN55212-2 e do Antagonista Canabinóide SR147778 na Evocação do Condicionamento Aversivo Contextual

Para investigar os efeitos da manipulação do sistema canabinóide na evocação de memórias aversivas, WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg, i.p.) e SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg, i.p.) foram administrados previamente à re-exposição dos animais à gaiola de condicionamento onde haviam sido submetidos ao processo de condicionamento aversivo contextual.

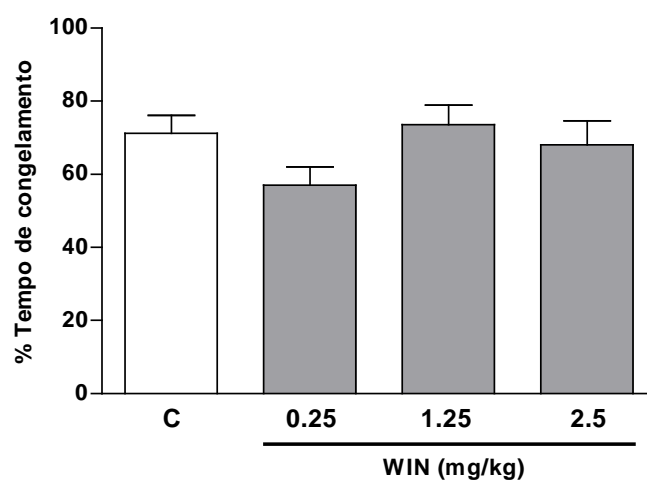


Figura 18 – Efeito da administração do agonista canabinóide WIN55212-2 (WIN) sobre a evocação do condicionamento aversivo contextual. Os animais foram submetidos ao condicionamento aversivo contextual e 24 h após injetados com WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C) e re-expostos à gaiola de condicionamento por 3 min. Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais durante o teste. (Controle/n=10, WIN 0,25/n=7, WIN 1,25/n=7, WIN 2,5/n=8).

A figura 18 representa os resultados do tratamento com WIN na etapa de evocação do condicionamento aversivo contextual. A ANOVA de 1 via não demonstrou efeito significativo para o fator tratamento [$F(3,28)=1,56$; $p=0,22$].

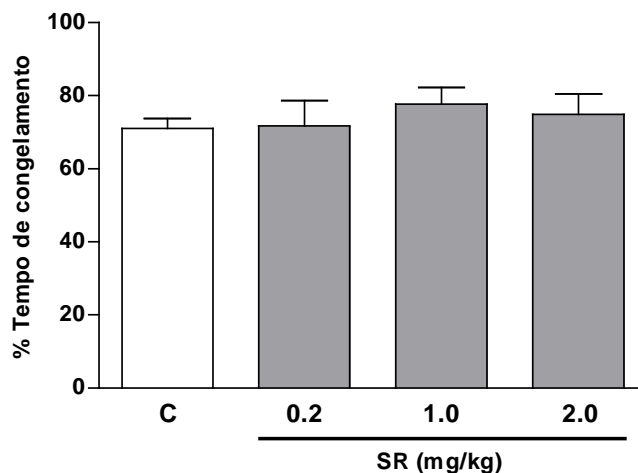


Figura 19 – Efeito da administração do antagonista canabinóide SR147778 (SR) sobre a evocação do condicionamento aversivo contextual. Os animais foram submetidos ao condicionamento aversivo contextual e 24 h após injetados com SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C) e re-expostos à gaiola de condicionamento por 3 min. Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média ± e.p.m.) expressa pelos animais durante o teste. (Controle/n=9, SR 0,2/n=8, SR 1,0/n=10, SR 2,0/n=9).

A figura 19 representa os resultados do tratamento com SR na etapa de evocação do condicionamento aversivo contextual. A ANOVA de 1 via não demonstrou efeito significativo para o fator tratamento [$F(3,32)=0,38$; $p=0,77$].

4.1.4 – Efeitos do Agonista Canabinóide WIN55212-2 e do Antagonista Canabinóide SR147778 na Extinção do Condicionamento Aversivo Contextual

Os efeitos da manipulação do sistema canabinóide na extinção de memórias aversivas foram investigados utilizando o condicionamento aversivo contextual. Para isso, os animais foram condicionados e 24 h depois injetados com WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg, i.p.) e SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg, i.p.) e submetidos ao processo de extinção de 3 re-exposições de 9 min à gaiola de

condicionamento, na ausência do choque nas patas. A figura 20 ilustra os resultados da administração de WIN antes de cada uma das três sessões de extinção (A) e antes da primeira sessão de extinção, dividida em blocos de 3 min (B). A ANOVA de 2 vias para os resultados da administração de WIN nas três sessões de extinção, revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F(3,29)=6,84$; $p=0,001$] e para o fator repetição [$F(2,58)=17,31$; $p=0,000001$], mas não para a interação entre estes dois fatores [$F(6,58)=1,15$; $p=0,34$]. A análise post-hoc posterior destes dados demonstrou que na terceira re-exposição o grupo controle atingiu uma extinção parcial do comportamento condicionado de congelamento, apresentando um menor tempo de congelamento quando comparado à primeira re-exposição ($p<0,05$). Os efeitos do WIN na extinção do condicionamento aversivo contextual foram dose-dependentes. Para o grupo tratado com a menor dose de WIN (0,25 mg/kg, i.p.), já na primeira re-exposição pôde-se observar uma diferença significativa em relação à primeira re-exposição do grupo controle e que permaneceu até a terceira re-exposição, sugerindo uma facilitação do processo de extinção do medo condicionado ($p<0,05$). Ao contrário, a dose mais alta (2,5 mg/kg, i.p.) provocou um prejuízo na extinção do condicionamento aversivo contextual, já que até a terceira re-exposição não se pode notar diferença estatística significativa em relação à primeira re-exposição do grupo controle ($p<0,05$). A dose intermediária, por sua vez, aparentemente não interferiu no tempo de congelamento apresentado pelos animais (Fig 20).

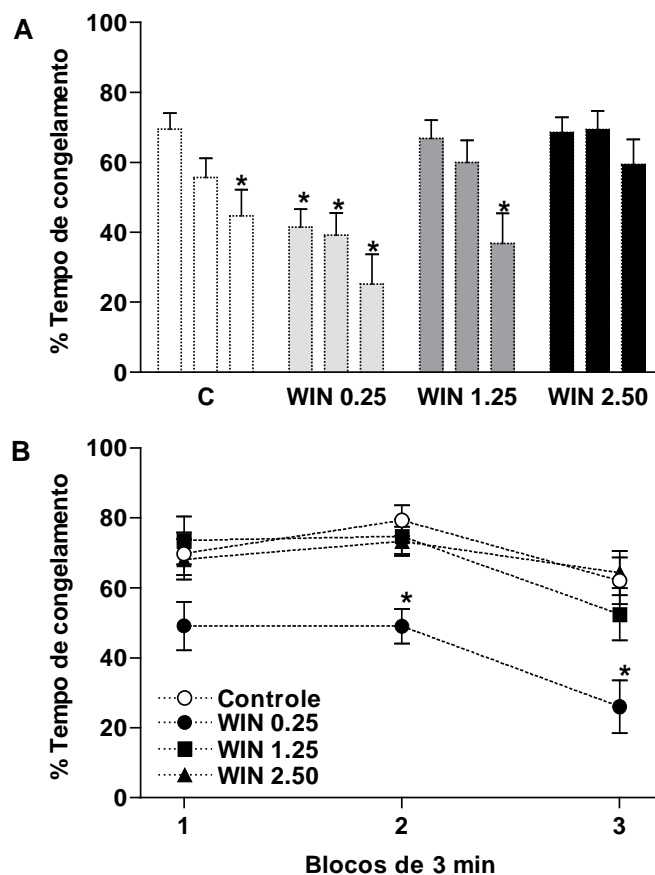


Figura 20 – Efeito da administração do agonista canabinóide WIN55212-2 (WIN) sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual. Os animais foram submetidos ao condicionamento aversivo contextual e 24 h após submetidos a 3 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h entre elas. WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C) foi administrado antes de cada sessão de extinção. (A) Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais em cada sessão de extinção. (B) Porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais durante a primeira sessão de extinção dividida em blocos de 3 min. * $p < 0,05$ comparado à primeira sessão/bloco do grupo controle (teste de Duncan). (Controle/ $n=9$, SR 0,2/ $n=7$, SR 1,0/ $n=7$, SR 2,0/ $n=10$).

A fim de se verificar uma possível influência do tratamento na extinção de curto prazo, observada durante a exposição ao EC, os dados da primeira re-exposição à gaiola de condicionamento foram analisados separadamente em blocos de 3 min. A ANOVA para estes dados demonstrou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F(3,29)=7,13$; $p=0,001$] e repetição [$F(2,58)=21,66$;

$p=0,000001$], mas não para a interação entre estes dois fatores [$F(6,58)=1,33$; $p=0,26$]. A análise post-hoc destes dados demonstrou que apenas o grupo tratado com WIN na dose de 0,25 mg/kg, i.p. reduziu significativamente os níveis de congelamento durante a sessão, que puderam ser observados durante o segundo e o terceiro blocos de 3 min ($p<0,05$). Corroborando os dados do experimento da influência da manipulação do sistema canabinóide na evocação de memórias aversivas, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e controle durante os 3 primeiros min de avaliação ($p=0,13$) (Figs 18,19 e 20).

A figura 21 ilustra os resultados da administração de SR antes de cada uma das três sessões de extinção (A) e antes da primeira sessão de extinção, dividida em blocos de 3 min (B). A ANOVA de 2 vias para os resultados da administração de SR nas três sessões de extinção, revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F(3,26)=5,18$; $p=0,006$] e para o fator repetição [$F(2,52)=11,62$; $p=0,00007$], mas não para a interação entre estes dois fatores [$F(6,52)= 0,73$; $p=0,63$]. Reproduzindo os dados anteriores, a análise post-hoc demonstrou que na terceira re-exposição o grupo controle atingiu uma extinção parcial do comportamento condicionado de congelamento, apresentando um menor tempo de congelamento quando comparado à primeira re-exposição ($p<0,05$). Similarmente aos efeitos do WIN, o SR também influenciou a extinção do condicionamento aversivo contextual de maneira dose-dependente.

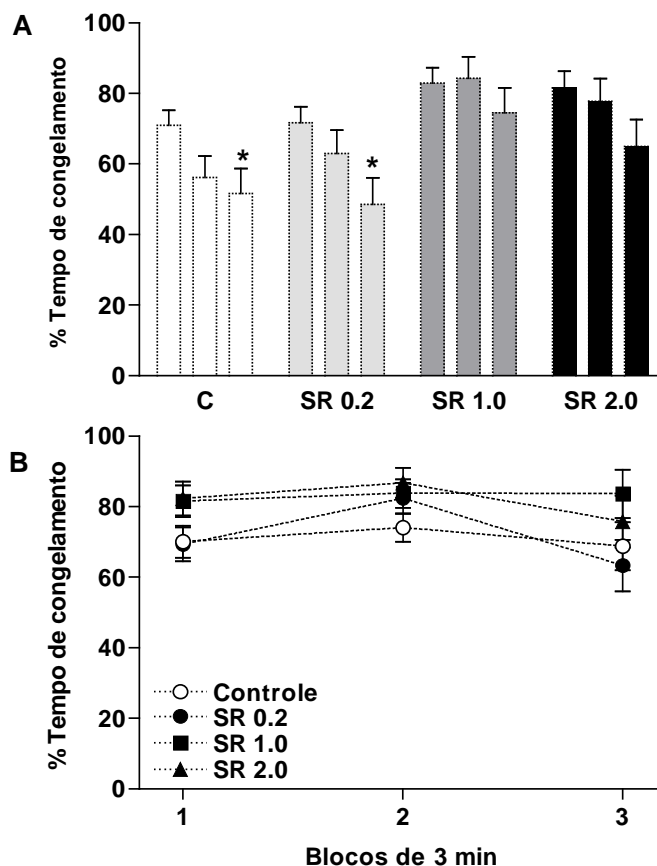


Figura 21 – Efeito da administração do antagonista canabinóide SR147778 (SR) sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual. Os animais foram submetidos ao condicionamento aversivo contextual e 24 h após submetidos a 3 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h entre elas. SR (0,2; 1,0; 2,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C) foi administrado antes de cada sessão de extinção. (A) Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais em cada sessão de extinção. (B) Porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais durante a primeira sessão de extinção dividida em blocos de 3 min. * $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do grupo controle (teste de Duncan). (Controle/ $n=8$, SR 0,2/ $n=7$, SR 1,0/ $n=8$, SR 2,0/ $n=7$).

A menor dose de SR testada (0,2 mg/kg,i.p.) aparentemente não interferiu na extinção do medo condicionado, já que este grupo apresentou extinção parcial na terceira sessão de maneira similar ao grupo controle. No entanto, o bloqueio dos receptores canabinóides CB1 por ambas as doses maiores de SR (1,0 e 2,0 mg/kg, i.p.) foi capaz de bloquear significativamente o processo de extinção, e até a terceira sessão não foram observadas diferenças em relação à primeira re-

exposição do grupo controle. A ANOVA para os dados da primeira re-exposição analisados separadamente em blocos de 3 min demonstrou efeito somente para o fator medida repetida [$F(2,52)=5,64$; $p=0,006$], não havendo efeito significativo para os fatores tratamento [$F(3,26)=2,05$; $p=0,13$] ou para a interação entre tratamento e medida repetida [$F(6,52)=1,22$; $p=0,31$]. Concordando com os resultados obtidos no experimento anterior, a análise post-hoc demonstrou que o grupo controle não diminui o tempo de permanência em congelamento durante a primeira re-exposição à gaiola de condicionamento (Figs 20 e 21).

4.1.5 – Efeito do Agonista Canabinóide WIN55212-2 na Aquisição do Condicionamento Aversivo Auditivo

A fim de se verificar se a ativação dos receptores canabinóides pelo WIN poderia prejudicar também a aquisição do condicionamento aversivo auditivo, os animais foram injetados com WIN antes de serem submetidos ao processo de condicionamento aversivo auditivo, com as mesmas doses utilizadas para o condicionamento aversivo contextual (0,25; 1,25; 2,5; 5,0 mg/kg, i.p.).

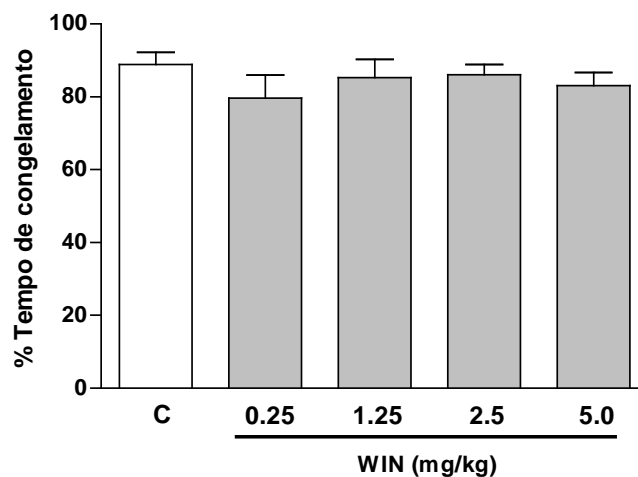


Figura 22 – Efeito da administração do agonista canabinóide WIN55212-2 (WIN) sobre a aquisição do condicionamento aversivo auditivo. Os animais foram injetados com WIN (0,25; 1,25; 2,5; 5,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C), submetidos ao condicionamento aversivo auditivo e 24 h após colocados em um novo ambiente e expostos ao som (EC) por 3 min. Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais durante o teste. (Controle/n=6, WIN 0,25/n=6, WIN 1,25/n=6, WIN 2,5/n=6, WIN 5,0/n=6).

A figura 22 representa os resultados do tratamento com WIN na etapa de aquisição do condicionamento aversivo auditivo. A ANOVA de 1 via não demonstrou efeito significativo para o fator tratamento [$F(4,25)=0,62$; $p=0,65$], indicando que o efeito da ativação do sistema canabinóide sobre a aquisição do condicionamento aversivo parece ocorrer exclusivamente na versão contextual.

4.1.6 – Participação dos Receptores Canabinóides CB1 no Prejuízo de Aquisição do Condicionamento Aversivo Contextual Induzido pelo Agonista Canabinóide WIN55212-2

Para avaliar se o prejuízo induzido pelo WIN na aquisição de memórias aversivas estaria relacionado à ativação dos receptores canabinóides CB1, executou-se novamente o protocolo anteriormente descrito para avaliar os efeitos do WIN (2,5 mg/kg, i.p.) na aquisição do condicionamento aversivo contextual, incluindo no presente a administração prévia de SR (1,0 mg/kg, i.p.), um antagonista seletivo para os receptores CB1, em uma dose que não exerce efeito *per se* na aquisição deste modelo comportamental.

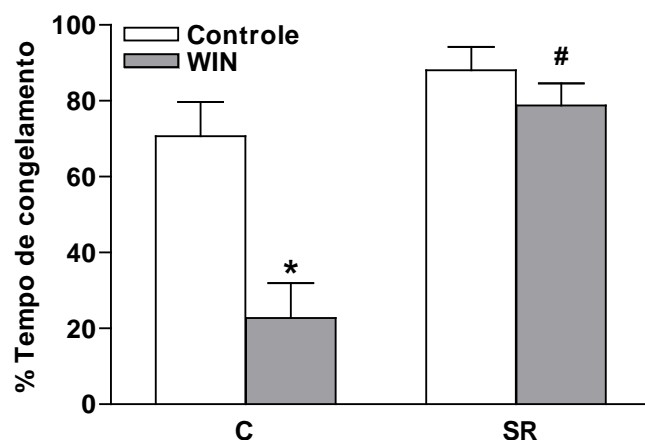


Figura 23 – Participação dos receptores CB1 nos efeitos do agonista canabinóide WIN55212-2 (WIN) sobre a aquisição do condicionamento aversivo contextual. Os animais foram injetados com SR147778 (SR, 1,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C), seguido de uma administração de WIN (2,5 mg/kg, i.p.) ou solução controle e submetidos ao condicionamento aversivo contextual. Vinte e quatro horas depois eles foram re-expostos à gaiola de condicionamento por 3 min. Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais durante o teste. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle # $p < 0,05$ comparado ao grupo WIN na ausência do SR (C-Controle/ $n=7$, C-WIN/ $n=8$, SR-C/ $n=7$, SR-WIN/ $n=8$).

Os resultados obtidos estão representados na figura 23. A ANOVA de 1 via revelou efeito para o fator tratamento [$F(3,26)=15,69$; $p=0,00001$]. A análise post-hoc demonstrou que os animais tratados antes do condicionamento com WIN apresentaram um menor tempo de congelamento quando comparados aos controles no dia do teste ($p<0,05$), confirmando os dados anteriores de que a administração de um agonista canabinóide prejudica a aquisição do condicionamento aversivo contextual (Fig 14). O grupo tratado apenas com SR, não apresentou diferenças em relação ao grupo controle. No entanto, quando o SR foi administrado previamente ao WIN em um outro grupo de animais, pôde-se observar que o SR preveniu os efeitos do WIN sobre a aquisição do condicionamento ($p<0,05$), dando evidências de que seus efeitos estariam relacionados à ativação de receptores canabinóides tipo CB1.

4.1.7 – Avaliação de Aprendizado Dependente de Estado no Condicionamento Aversivo Contextual

Para investigar se o prejuízo induzido pelo WIN na aquisição de memórias aversivas poderia ser decorrente de um efeito de aprendizado dependente de estado, quatro grupos distintos de animais foram administrados com WIN (2,5 mg/kg, i.p.) ou solução controle antes do condicionamento aversivo contextual e antes da re-exposição à gaiola de condicionamento. Os resultados deste experimento estão representados na figura 24.

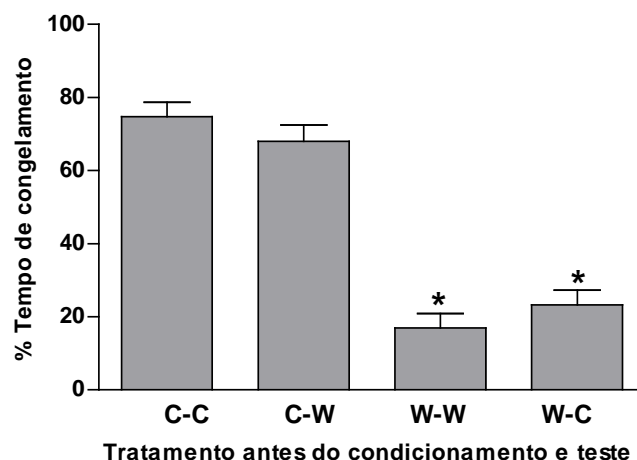


Figura 24 – Avaliação de aprendizado dependente de estado nos efeitos do WIN55212-2 (WIN) no condicionamento aversivo contextual. Os animais foram injetados i.p. com solução controle (C) antes do condicionamento e teste (C-C), com solução controle antes do condicionamento e WIN (2,5 mg/kg) antes do teste (C-W), com WIN antes do condicionamento e teste (C-W) ou com WIN antes do condicionamento e solução controle antes do teste (W-C). Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média ± e.p.m.) expressa pelos animais durante o teste. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste de Duncan). (C-C/n=6, C-W/n=6, W-W/n=6, C-W/n=7).

A ANOVA de 1 via para estes dados revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F(3,21)=28,08$; $p=0,000001$]. A análise post-hoc demonstrou que o grupo tratado com WIN antes do condicionamento apresentou um menor tempo de congelamento quando comparados ao grupo controle no dia do teste ($p < 0,05$) confirmando dados de dois experimentos anteriores (Figs 14, 23 e 24). O grupo tratado com WIN antes do condicionamento e antes do teste também demonstrou o mesmo prejuízo de aquisição do condicionamento, reforçando este dado, e sugerindo que não houve efeito de aprendizado dependente de estado neste experimento (Fig 24). Além disso, o grupo tratado com solução controle antes do condicionamento e com WIN antes do teste não apresentou prejuízo na evocação do condicionamento contextual, reforçando a idéia de que embora ativação do sistema canabinóide prejudique a aquisição do condicionamento contextual, a

administração de WIN parece não influenciar a evocação de memórias aversivas, pelo menos considerando a mesma faixa de dose (Fig 18).

4.1.8 – Participação dos Receptores Canabinóides CB1 nos Efeitos do WIN55212-2 na Extinção de Memórias Aversivas Antigas

Como existem evidências de que memórias aversivas antigas podem ser mais resistentes à extinção comparadas às memórias recentes de longa duração (Suzuki *et al.*, 2004), avaliou-se se a ativação do sistema canabinóide pelo agonista WIN (0,25 mg/kg, i.p.) poderia facilitar também a extinção de memórias aversivas antigas. Neste mesmo experimento, os animais foram condicionados ao contexto e ao som, e 30 dias após, submetidos ao processo de extinção do condicionamento contextual e depois testados para a evocação do som e do contexto na ausência de tratamento farmacológico para se avaliar se os efeitos do WIN poderiam ser seletivos para as memórias que sofreram processo de extinção e se poderia se observar efeito de longa duração na extinção do condicionamento aversivo contextual. Além disso, a fim de se verificar se a facilitação da extinção de memórias aversivas estaria relacionada à ativação de receptores canabinóides CB1, o antagonista SR (0,2 mg/kg, i.p.) foi administrado previamente à administração de WIN em um dos grupos experimentais.

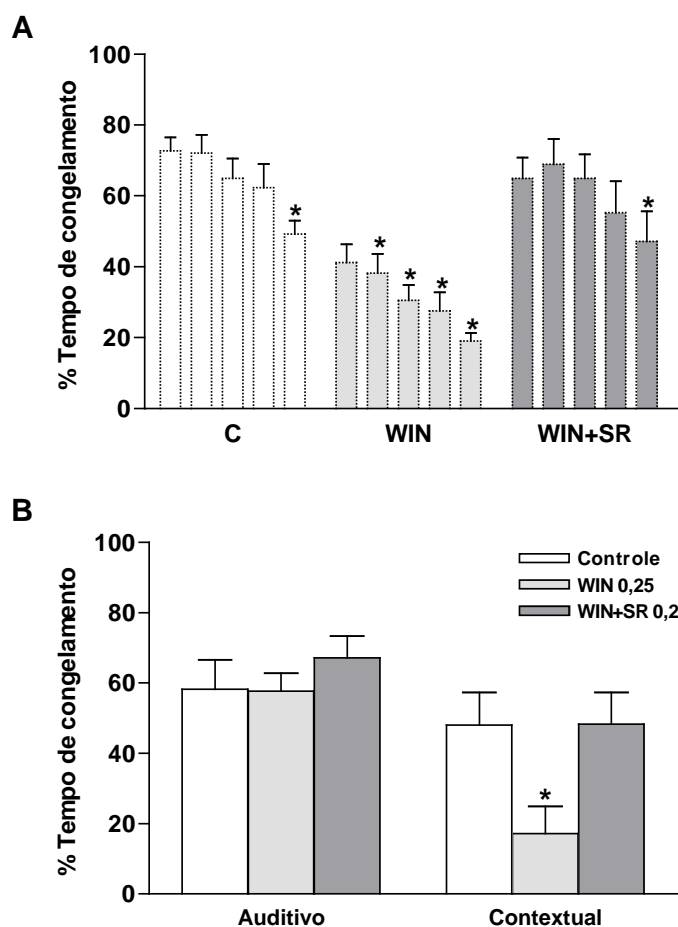


Figura 25 – Participação dos receptores CB1 no efeito da administração do agonista canabinóide WIN55212-2 (WIN) sobre a extinção de memórias aversivas antigas. Os animais foram submetidos aos condicionamentos aversivos auditivo e contextual e 30 dias após submetidos a 5 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h entre elas. Os animais receberam uma injeção de SR147778 (SR, 0,2 mg/kg, i.p.) ou solução controle seguida de uma injeção de WIN (0,25 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C) antes de cada sessão de extinção. Vinte e quatro horas após a sessão os animais foram testados no condicionamento aversivo auditivo e 24 h após no condicionamento aversivo contextual, ambos na ausência de tratamento farmacológico. (A) Cada barra representa a porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais em cada sessão de extinção. (B) Esquerda: Porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais durante a exposição ao som (EC) por 3 min. Direita: Porcentagem de tempo de congelamento (média \pm e.p.m.) expressa pelos animais durante a re-exposição à gaiola de condicionamento por 3 min. * $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do grupo controle (teste de Duncan). (Controle/ $n=9$, WIN 0,25/ $n=12$, WIN+SR 0,2/ $n=11$).

Os resultados das 5 sessões de extinção e dos subseqüentes testes de evocação do condicionamento auditivo e contextual estão representados respectivamente na figura 25 A e B. A ANOVA de 2 vias para os resultados da

extinção do condicionamento aversivo contextual demonstrou efeito significantes para os fatores tratamento [$F(2,29)=13,62$; $p=0,00007$] e medida repetida [$F(4,116)=18,02$; $p=0,000001$], mas não para a interação entre estes dois fatores [$F(8,116)=0,40$; $p=0,92$]. A análise post-hoc revelou que após 5 sessões de extinção os animais controles apresentaram níveis reduzidos de congelamento quando comparados à primeira sessão ($p<0,05$), demonstrando que o protocolo foi eficaz em provocar a extinção parcial do condicionado aversivo contextual. Reforçando os dados de experimento anterior, a administração de WIN facilitou o processo de extinção, visto que os animais tratados apresentaram níveis reduzidos de congelamento já na segunda sessão comparado à primeira sessão do grupo controle ($p<0,05$).

Por sua vez, o tratamento com SR previamente à administração de WIN preveniu a ocorrência deste fenômeno, em uma dose que per se não influenciou os níveis de congelamento expresso pelos animais ($p<0,05$). Estes resultados evidenciam que o WIN facilita a extinção do condicionamento aversivo contextual através da ativação de receptores canabinóides tipo CB1. A ANOVA de 1 via para o teste de evocação do condicionamento aversivo auditivo realizado na ausência de tratamento 24 h após o término das sessões de extinção, demonstrou que o tratamento com WIN não influenciou os níveis de congelamento apresentados pelos animais quando re-expostos ao EC som [$F(2,29)=0,71$; $p=0,50$], sugerindo que embora tenha facilitado a extinção do condicionamento aversivo, o tratamento com WIN não prejudicou a integridade de outras memórias associativas destes animais. Por outro lado, a ANOVA de 1 via dos dados referentes à re-exposição à gaiola de condicionamento na ausência de tratamento farmacológico demonstrou

que houve efeito persistente deste tratamento nos níveis de congelamento expressos pelos animais [$F(2,29)=4,48$; $p=0,02$]. A análise post-hoc revelou que os animais tratados com WIN durante a sessão de extinção apresentaram níveis reduzidos de congelamento durante a re-exposição à gaiola de condicionamento quando comparados ao grupo controle ($p<0,05$) e que este efeito foi revertido pelo pré-tratamento com SR, demonstrando que foi relacionado à ativação dos receptores canabinóides CB1 ($p<0,05$).

4.2 – AVALIAÇÃO MOTORA

Como os agonistas canabinóides podem afetar a atividade locomotora (Darmani, 2001), o teste do campo aberto foi utilizado para se descartar outros efeitos do WIN (0,25; 1,25; 2,5; 5,0 mg/kg, i.p.) que pudessem interferir com a interpretação dos resultados obtidos em outros modelos comportamentais. Os resultados desta avaliação estão representados na figura 26. A ANOVA de 1 via para estes dados demonstrou efeito significativo para o fator tratamento [$F(4,35)=4,88$; $p=0,003$]. A análise post-hoc revelou que apenas a dose mais alta de WIN (5,0 mg/kg, i.p.) induziu efeitos hipolocomotores comparado ao grupo controle ($p<0,05$).

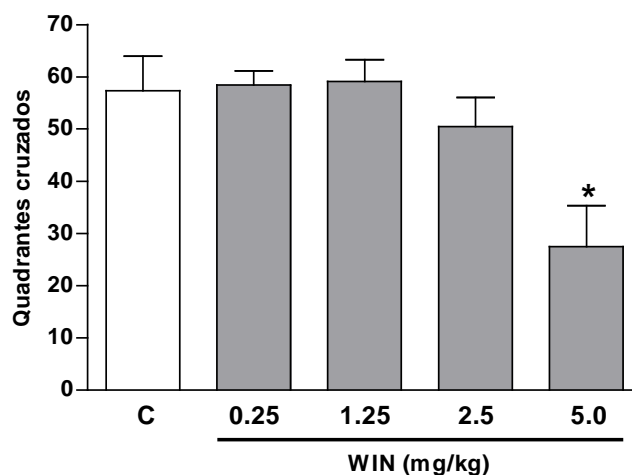


Figura 26 – Efeito da administração do agonista canabinóide WIN55212-2 (WIN) na atividade locomotora dos animais. Os animais foram injetados com WIN (0,25; 1,25; 2,5; 5,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (C) e testados no campo aberto por 3 min. Cada barra representa o número de quadrantes cruzados (média \pm e.p.m.) pelos animais durante avaliação no campo aberto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (teste de Duncan). (Controle/ $n=10$, WIN 0,25/ $n=7$, WIN 1,25/ $n=7$, WIN 2,5/ $n=8$, WIN 5,0/ $n=8$).

4.3 – LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO POTENCIALIZADO PELO MEDO

Há evidências de que a manipulação do sistema canabinóide pode influenciar o comportamento tipo ansiedade de animais avaliados no LCE (Haller *et al.*, 2004). Por este motivo, e para investigar a possível influência do sistema canabinóide no comportamento tipo ansiedade provocado pela evocação de memórias aversivas, os animais foram avaliados no modelo do LCE potencializado pelo medo, previamente proposto por Mechiel Korte e De Boer (Mechiel Korte e De Boer, 2003). Neste protocolo, um grupo de animais foi condicionado, outro grupo apenas recebeu o choque nas patas dentro da gaiola de condicionamento (mas não foi re-exposto) e um terceiro grupo de animais foi apenas exposto e re-exposto à gaiola de condicionamento, mas não recebeu choque nas patas. Os

animais foram injetados com WIN (0,25 mg/kg, i.p.) ou solução controle antes da re-exposição à gaiola de condicionamento e então colocados no labirinto em cruz elevado para avaliação comportamental. Os resultados deste experimento estão expressos na tabela 3.

Tabela 3 – Efeito do agonista canabinóide WIN55212-2 (WIN, 0.25 mg/kg, i.p.) no comportamento dos animais avaliado no labirinto em cruz elevado. Os animais foram condicionados, receberam somente choque 24 h antes ou foram somente expostos à gaiola de condicionamento (naive) e imediatamente após testados no labirinto em cruz elevado por 5 min.

<i>Grupo</i>	<i>Tratamento</i>	<i>% Tempo nos braços abertos</i>	<i>% Entradas nos braços abertos</i>	<i>Entradas nos braços fechados</i>	<i>n</i>
Naive	Solução Controle	22.89 ± 2.75	41.31 ± 3.72	7.33 ± 0.37	9
Naive	WIN	25.11 ± 5.02	42.00 ± 7.35	7.11 ± 0.92	9
Condicionado	Solução Controle	18.26 ± 1.67	49.82 ± 1.16	5.00 ± 0.55 *	9
Condicionado	WIN	18.52 ± 2.28	46.18 ± 5.04	5.11 ± 0.70	9
Choque	Solução Controle	10.12 ± 2.98 *	36.65 ± 10.46	3.25 ± 0.65 *	8
Choque	WIN	11.83 ± 3.30	36.00 ± 3.77	6.12 ± 0.89	8

* p<0,05 comparado ao grupo Naive/Controle (teste de Duncan)

A ANOVA de 2 vias para o parâmetro tempo de permanência nos braços abertos revelou efeito significativo somente para o fator grupo [$F(2,46)= 8,19$; $p=0,0009$], mas não para tratamento [$F(1,46)=0,29$; $p=0,59$] ou para a interação [$F(2,46)=0,05$; $p=0,95$] entre estes dois fatores. A análise post-hoc demonstrou que o grupo que recebeu apenas o choque nas patas apresentou uma redução no tempo de permanência nos braços abertos em comparação ao grupo controle ($p<0,05$). A ANOVA para o parâmetro número de entradas nos braços abertos não demonstrou efeito estatístico significativo para grupo [$F(2,46)=1,95$; $p=0,15$], tratamento [$F(1,46)=0,06$; $p=0,80$] ou para a interação entre estes dois fatores [$F(2,46)=0,07$; $p=0,93$]. A ANOVA para o parâmetro número de entradas nos

braços fechados demonstrou efeito significativo para grupo [$F(2,46)=7,69$; $p=0,001$], mas não para tratamento [$F(1,46)=2,58$; $p=0,11$] ou para a interação entre estes fatores [$F(2,46)=2,81$; $p=0,07$]. A análise post-hoc posterior revelou que ambos os grupos “condicionado” e “choque” apresentaram uma redução no número de entradas nos braços fechados quando comparados ao grupo controle ($p<0,05$). Em síntese, os resultados deste experimento demonstram que a experiência aversiva de receber um choque nas patas induziu um efeito ansiogênico de longa duração (24 h) nos animais, que não foi influenciado pelo tratamento com WIN (Tabela 3). Da mesma forma, o choque nas patas e a evocação desta experiência aversiva provocada pela re-exposição à gaiola de condicionamento causaram um efeito de hipolocomoção nos animais, que poderia ser decorrente de uma elevação no comportamento de congelamento dos animais quando expostos ao labirinto em cruz elevado, embora este parâmetro não tenha sido avaliado. De toda forma, não foram observados efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos do tratamento com WIN para os animais naive, que receberam choque nas patas ou que foram submetidos à evocação do condicionamento aversivo contextual (Tabela 3).

4.4 – TAREFA REVERSA DO LABIRINTO AQUÁTICO

Por fim, para se avaliar se os efeitos da manipulação do sistema canabinóide na extinção do condicionamento aversivo poderiam ser estendidos para outros tipos de memória com diferentes demandas motivacionais e comportamentais, os animais foram submetidos à tarefa reversa do labirinto aquático. Para isto, os animais foram treinados por dois dias (6 sessões cada) na tarefa espacial do labirinto aquático e 24 h depois injetados com WIN (0,25 mg/kg, i.p.) ou SR (1,0 mg/kg, i.p.) e submetidos à tarefa reversa do labirinto aquático, na qual a posição da plataforma alvo havia sido trocada para o quadrante diametralmente oposto. A figura 27 representa os dados dos dois dias de treinamento na tarefa espacial na ausência de tratamento farmacológico (A) e na tarefa reversa do labirinto aquático (B). A ANOVA de 2 vias revelou efeito significativo para o fator medida repetida tanto para o dia 1 [$F(5,105)=24,63$; $p=0,000001$], quanto para o dia 2 de treino [$F(5,105)=9,45$; $p=0,000001$], demonstrando que os animais melhoraram a performance em encontrar a plataforma submersa com a sucessiva repetição do procedimento. Contudo, não houve diferenças entre os grupos durante a etapa de aquisição da informação espacial (dia 1: [$F(2,21)=0,33$; $p=0,72$], dia 2: [$F(2,21)=3,21$; $p=0,06$]). Para a tarefa reversa, A ANOVA de 2 vias não demonstrou efeito para o tratamento [$F(2,21)=1,91$; $p=0,17$], mas demonstrou efeito significativo para a medida repetida [$F(5,105)=17,16$; $p=0,000001$] e para a interação entre o tratamento e a repetição [$F(10,105)=2,61$; $p=0,007$].

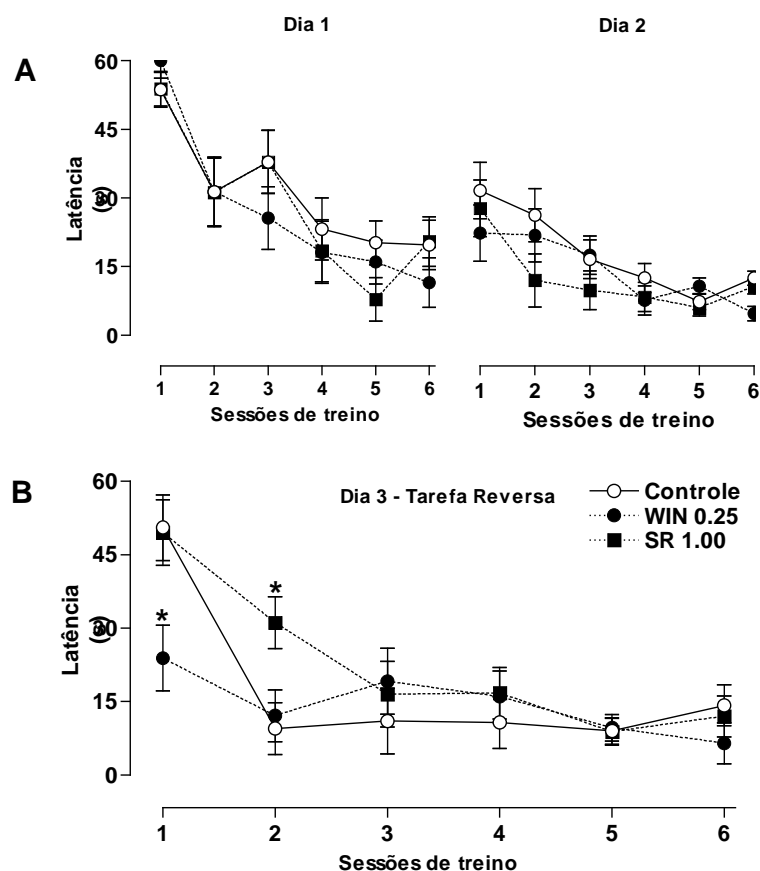


Figura 27 – Efeito da administração de WIN55212-2 (WIN) e SR147778 (SR) sobre o desempenho de animais na tarefa reversa do labirinto aquático. Os animais foram treinados por 2 dias na tarefa espacial do labirinto aquático e 24 h depois injetados i.p. com WIN (0,25 mg/kg), SR (1,0 mg/kg) ou solução controle e submetidos à tarefa reversa do labirinto aquático. Cada ponto representa a latência (média \pm e.p.m.) necessária para o animal encontrar a plataforma submersa. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle na mesma sessão (teste de Duncan). (Controle/ $n=8$, WIN 0,25/ $n=8$, SR 1,0/ $n=8$).

A análise post-hoc demonstrou que o tratamento com WIN diminui o tempo necessário para encontrar a plataforma na primeira sessão da tarefa reversa, enquanto o tratamento com SR aumentou a latência na segunda sessão da tarefa reversa comparado aos animais do grupo controle ($p < 0,05$) (Fig 27).

5 - DISCUSSÃO

Os presentes resultados demonstram que a apresentação de um estímulo condicionado, seja ele som ou contexto, concomitantemente a um componente aversivo, o choque, induz a formação de uma memória aversiva associativa de longa duração, em um processo denominado condicionamento aversivo (Figs 12 e 13). Esta memória pode durar de 24 h a pelo menos 30 dias (Fig 25). Além do mais, a administração do agonista canabinóide WIN55212-2 prejudicou de forma dose-dependente a aquisição do CA contextual, uma tarefa mnemônica dependente do hipocampo, mantendo intacto o CA a um estímulo auditivo, uma tarefa considerada independente desta estrutura cerebral (Figs 14 e 22). Outro achado importante foi que a administração do antagonista canabinóide SR prejudicou a extinção do condicionamento aversivo contextual, reforçando a idéia de que a liberação de endocanabinóides estaria envolvida neste processo (Fig 21). Consecutivamente, a administração do agonista canabinóide WIN55212-2 facilitou a extinção do CA contextual para animais condicionados 24 h ou 30 dias antes das sessões de extinção (Fig 20 e 25). Este efeito facilitatório do WIN55212-2 sobre a extinção do condicionamento aversivo não deve ser atribuído a alterações em comportamentos tipo ansiedade (Tabela 3) e aparentemente não se trata de um efeito específico para memórias aversivas, já que ele também pôde ser observado na tarefa reversa do labirinto aquático (Fig 27). Ambos os efeitos encontrados para o agonista canabinóide (prejuízo de aquisição e facilitação da extinção) foram prevenidos pela administração do antagonista canabinóide CB1, em doses sub-efetivas, confirmando farmacologicamente que estes efeitos do

WIN55212-2 estão relacionados à ativação dos receptores canabinóides CB1, responsável pela grande maioria dos efeitos comportamentais de canabinóides (Figs 23 e 25).

A indução do prejuízo de aquisição de memória aversiva contextual induzido pelo WIN55212-2, na ausência de qualquer efeito sobre o CA auditivo, sugere que os canabinóides seletivamente impedem a aquisição de tarefas de memória dependentes de hipocampo. Apesar de até então esta hipótese não ter sido testada no CA, já havia sido demonstrado anteriormente que os canabinóides são capazes de mimetizar algumas características de lesões hipocampais em modelos comportamentais de aprendizado e memória que permitem essa dissociação em tarefas dependentes e independentes de hipocampo (Davies *et al.*, 2002). Lichtman e Martin (1996) demonstraram que a administração do agonista canabinóide Δ -9-THC prejudica o desempenho de animais avaliados no labirinto radial de 8 braços, sugerindo um prejuízo na execução de tarefas que envolvam o uso de memória espacial, dependente de hipocampo. Estes experimentos foram confirmados por resultados de nosso laboratório utilizando o labirinto aquático, que demonstraram que a administração de Δ^9 -THC aos animais previamente às sessões de aquisição da tarefa de memória de referência espacial prejudica o aprendizado da localização da plataforma submersa (Da Silva e Takahashi, 2002). Não foram observadas alterações de memória nos animais quando o Δ^9 -THC foi administrado imediatamente após as sessões de treino (etapa de consolidação) ou imediatamente antes de uma sessão de teste (etapa de evocação) (Da Silva e Takahashi, 2002). Ferrari *et al.* (1999) utilizaram o

agonista canabinóide sintético HU-210 e o labirinto aquático para demonstrar que a administração deste agonista prejudica o aprendizado da tarefa de referência espacial, interferindo com a etapa de aquisição deste modelo. Entretanto, nenhum efeito foi observado quando o mesmo agonista foi administrado previamente às sessões de treino da tarefa com pista visual, utilizada para verificação do desempenho comportamental independente de hipocampo, além de alterações fisiológicas mais generalizadas como efeitos na locomoção ou nas funções sensoriais (Ferrari *et al.*, 1999). Um experimento similar foi realizado por Lichtman e Martin, confirmando estes dados e estendendo as conclusões para o Δ^9 -THC (Lichtman e Martin, 1996). De acordo com as evidências obtidas em experimentos de administração sistêmica aguda de agonistas canabinóides, estudos utilizando administração intra-hipocampal de agonistas canabinóides igualmente concluíram que estes compostos são capazes de interferir seletivamente na função do hipocampo prejudicando a aquisição de memórias que envolvem processamento espacial/contextual (Lichtman *et al.*, 1995; Egashira *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2004). Neste contexto, nossos resultados estendem para um modelo animal de memórias aversivas as descobertas previamente obtidas com o labirinto aquático e com o labirinto radial de 8 braços. Além do prejuízo na aquisição de memórias espaciais, também é bastante conhecida a capacidade de agonistas canabinóides de interferir no desempenho de animais avaliados em tarefas comportamentais de memória de trabalho (Lichtman e Martin, 1996).

Poder-se-ia especular que modificações comportamentais menos sutis, como alterações locomotoras, sensoriais ou motivacionais (como a sensibilidade

ao choque) poderiam interferir na interpretação dos resultados obtidos no modelo do CA contextual. No entanto, a ausência de efeito na aquisição do CA auditivo é uma evidência contra o argumento de que os canabinóides pudessem interferir com o CA contextual de alguma maneira indireta ou indiscriminada, já que uma alteração desta natureza provavelmente interferiria em ambas as tarefas de CA. De toda forma, experimentos que pudessem ajudar a dirimir estas dúvidas foram realizados. O campo aberto foi utilizado para se avaliar possíveis alterações nos parâmetros locomotores induzidas pela administração de WIN55212-2, utilizando a mesma faixa de doses do experimento de aquisição do CA contextual (WIN 0,25; 1,25; 2,5; 5,0 mg/kg i.p.). Neste experimento, somente a dose mais alta de WIN55212-2 (5,0 mg/kg, i.p.) interferiu na locomoção dos animais, reduzindo o número de cruzamentos realizados durante o tempo de avaliação (Fig 26). Considerando que as doses de 2,5 e 5,0 mg/kg haviam sido efetivas em prejudicar a aquisição do condicionamento aversivo contextual (Fig 14), a dose de 5,0 mg/kg foi excluída na realização dos experimentos subseqüentes visando diminuir a interferência de alterações locomotoras na interpretação de seus resultados. Um segundo protocolo de aquisição do CA foi realizado para se avaliar um possível efeito de aprendizado dependente de estado nos efeitos do WIN sobre esta etapa da memória. Este efeito é verificado quando alterações sensoriais induzidas por drogas interferem no processo de aquisição de uma informação espacial/contextual, de forma que o indivíduo só irá se recordar da experiência quando estiver novamente sob o efeito da droga geradora destas alterações sensoriais (Izquierdo *et al.*, 1988). Os animais injetados com WIN55212-2 previamente ao CA contextual apresentaram prejuízo na aquisição do

condicionamento, reproduzindo o resultado dos experimentos iniciais (Figs 14 e 23). Da mesma forma, os animais que receberam uma injeção de WIN55212-2 somente antes da re-exposição à gaiola de condicionamento não apresentaram alterações em relação ao grupo controle, confirmando o experimento de evocação anterior (Fig 19). Além disso, os animais que receberam WIN55212-2 antes de cada uma das exposições à gaiola de condicionamento apresentaram alterações de memória semelhantes ao grupo tratado somente antes da re-exposição, demonstrando que o prejuízo de aquisição provocado pelo WIN55212-2 não foi devido a um aprendizado dependente de estado (Fig 24).

Com o intuito de investigar se o prejuízo de aquisição do CA induzido pelo WIN55212-2 estaria relacionado à ativação dos receptores canabinóides CB1, foi realizado um protocolo considerando as mesmas condições experimentais do experimento de aquisição do CA contextual, com a diferença que previamente à administração do agonista canabinóide, os animais foram injetados com o antagonista seletivo dos receptores canabinóides CB1, o SR147778 recentemente desenvolvido a partir de uma alteração química na estrutura molecular do antagonista SR141716A (Rinaldi-Carmona *et al.*, 2004). Neste experimento o antagonista canabinóide SR147778 (1,0 mg/kg, i.p.) preveniu os efeitos amnésicos do agonista canabinóide WIN55212-2, demonstrando que os efeitos deste agonista sobre a etapa de aquisição do CA contextual foram devidos à ativação dos receptores canabinóides CB1 (Fig 23). Estes resultados estão de acordo com estudos prévios demonstrando que o SR141716A, outro antagonista seletivo dos receptores canabinóides CB1, é capaz de prevenir o prejuízo de aquisição de memória induzido pelo Δ -9-THC em uma tarefa de comportamento apetitivo

operante (Brodkin e Moerschbaecher, 1997), no labirinto radial de 8 braços (Mishima *et al.*, 2001) e na tarefa espacial do labirinto aquático (Da Silva e Takahashi, 2002). Além do mais, animais *knock-out* para os receptores canabinóides CB1 não apresentam prejuízos cognitivos quando administrados com Δ^9 -THC e avaliados na tarefa de referência espacial do labirinto aquático, enfatizando a descoberta de que o prejuízo de aprendizado induzido por agonistas canabinóides ocorre pela ativação dos receptores CB₁ (Varvel e Lichtman, 2002).

Já que a ativação dos receptores canabinóides CB₁ foi capaz de prejudicar a aquisição do CA contextual de uma maneira dependente dos receptores canabinóides CB1, fomos investigar se o bloqueio destes mesmos receptores poderia resultar em um efeito facilitatório na aquisição de memórias aversivas, utilizando o CA contextual (Fig 15). No entanto, mesmo utilizando uma faixa de dose maior do que a utilizada para antagonizar os efeitos do WIN55212-2, não foi observado nenhum efeito da administração do antagonista canabinóide SR147778 sobre a aquisição deste paradigma comportamental (Fig 15). Este achado contrasta com resultados recentes de nosso laboratório utilizando o antagonista SR141716A em outro modelo de memórias aversivas, o labirinto em “T” elevado (Takahashi *et al.*, 2005). Além disso, estudo anterior havia demonstrado efeito facilitatório do SR141716A na aquisição do labirinto radial de 8 braços (Lichtman, 2000) e em reverter os efeitos amnésicos da administração de proteína beta-amilóide por via intracerebroventricular (i.c.v.), considerado um modelo animal bastante promissor no estudo dos déficits cognitivos apresentados na doença de Alzheimer (Mazzola *et al.*, 2003). No entanto, nossos resultados estão de acordo

com estudo realizado por Marsicano et al. (2002) que, investigando a formação de memórias aversivas em camundongos, não encontraram efeito facilitador do SR141716A (3 mg/kg, i.p.) na aquisição do condicionamento aversivo auditivo (Marsicano *et al.*, 2002). Talvez estas diferenças observadas nos efeitos de antagonistas canabinóides sobre a aquisição de memórias residam em particularidades dos protocolos e dos modelos animais utilizados, como discutido a seguir. No labirinto em “T” elevado os camundongos foram colocados no braço fechado do labirinto até saírem para um dos seus dois braços abertos e imediatamente após colocados repetidamente no braço fechado até atingirem um critério de permanência de 300 s com as 4 patas neste braço. Os animais tratados com SR141716A (1,0 mg/kg, i.p.) antes da sessão de aquisição (re-exposições sucessivas ao braço fechado) apresentaram um melhor desempenho no teste realizado 24 h após (Takahashi *et al.*, 2005). No labirinto radial de 8 braços, os ratos foram administrados com SR141716A (3 mg/kg, i.p.) e colocados em um labirinto radial de 8 braços, com um *pellet* de ração disponível na extremidade de cada braço, exceto em um deles, cuja entrada havia sido bloqueada por uma porta de acrílico. Os animais então exploravam todo o labirinto e após terem achado o *pellet* de ração em todos os braços possíveis, eles eram retirados do aparelho e retornavam ao labirinto após um intervalo variável de 1, 2, 4, 6 e 24 h para uma sessão de teste com todos os braços do labirinto desobstruídos e sem *pellet* de ração em suas extremidades. A administração de SR141716A (3,0 mg/kg, i.p.) antes da primeira exposição ao labirinto melhorou o desempenho destes animais comparados ao grupo controle quando re-expostos a intervalos iguais a 6 ou 24 h entre as exposições (Lichtman, 2000). Já no experimento com proteína beta-

amilóide, os animais receberam uma injeção i.c.v dos fragmentos 25-35 ou 1-42 da proteína beta-amilóide e 7 dias depois foram treinados no modelo da esquiva inibitória tipo *step-through*, realizado em uma caixa com dois compartimentos, um claro e um escuro, na qual o animal era exposto ao compartimento claro e imediatamente após entrar no ambiente escuro recebia um choque nas patas (Mazzola *et al.*, 2003). Os animais foram recolocados no compartimento claro da caixa 1 e 7 dias após o treino. Neste caso o SR141716A (1,0 mg/kg, i.p.) só foi capaz de reverter os prejuízos causados pela administração da proteína beta-amilóide (ambos os fragmentos), mas não obteve efeito facilitador *per se* na tarefa de esquiva inibitória (Mazzola *et al.*, 2003). Da mesma forma, não foram observados efeitos facilitatórios do SR141716A (3,0 mg/kg, i.p.) na aquisição do CA auditivo realizado com um protocolo de apenas um pareamento som-choque (Marsicano *et al.*, 2002). Consideradas como um todo, estas evidências parecem sugerir que o bloqueio dos receptores canabinóides CB1 pela administração de um antagonista seletivo seja capaz de favorecer a aquisição de informações e conseqüente formação de memória de longo prazo apenas em modelos animais cuja etapa de aquisição seja constituída de múltiplo acesso à informação a ser armazenada, como é o caso do labirinto em “T” elevado (cerca de 5 exposições ao braço fechado para adquirir o critério de permanência) e do labirinto radial de 8 braços (entrada em 7 braços durante a sessão de aquisição), mas não em modelos animais nos quais a etapa de aquisição seja constituída de um único acesso à informação, como no caso do CA contextual nos presentes resultados, do CA auditivo de um único pareamento (Marsicano *et al.*, 2002) e da esquiva inibitória (Mazzola *et al.*, 2003). Se isto for verdade, poder-se-ia sugerir que a ação

dos antagonistas seria de facilitar um processamento *on-line* destas informações, reforçando, a cada acesso, a memória de curto prazo utilizada durante a execução da etapa de aquisição destes modelos comportamentais. Experimentos utilizando antagonistas canabinóides seletivos para os receptores CB1 em modelos animais de memória de trabalho (processamento *on-line*) e memória de curto-prazo poderiam ser úteis para elucidar esta questão, mas até o presente momento estes estudos são escassos e se concentram propositalmente em utilizar doses sub-efetivas nestes modelos para reverter ou prevenir os prejuízos induzidos por agonistas canabinóides (Lichtman e Martin, 1996; Mallet e Beninger, 1998; Mishima *et al.*, 2001; Da Silva e Takahashi, 2002; Hampson *et al.*, 2003). É importante ressaltar que o antagonista canabinóide utilizado nos presentes experimentos não foi o mesmo utilizado nos demais estudos, assim poderia ser especulado que apenas o antagonista SR141716A seria capaz de influenciar os processos mnemônicos. No entanto, esta dúvida pode ser resolvida pela observação de que ambos os antagonistas são capazes de reverter o prejuízo do WIN55212-2 na aquisição do CA contextual, demonstrando que o SR147778 pode ser considerado uma ferramenta útil para o estudo do papel dos receptores CB1 nos processos mnemônicos, apesar de pelo menos ainda não terem sido observadas diferenças na magnitude das respostas fisiológicas em relação ao antagonista previamente desenvolvido (Gessa *et al.*, 2005; Pamplona e Takahashi, 2006).

Variações similares nas respostas obtidas com o uso de antagonistas canabinóides tem sido obtidas com o uso de camundongos *knock-out* para os receptores canabinóides CB1. Reibaud et al (1999) demonstraram que os animais

knock-out possuem um melhor desempenho no modelo de reconhecimento de objeto com intervalos comparados aos camundongos selvagens. Os animais *knock-out* discriminaram um objeto familiar de um apresentado pela primeira vez até pelo menos 48 h após a primeira exposição, enquanto os animais selvagens só foram capazes de discriminá-los no intervalo de 3 h, tendo perdido essa capacidade 24 h após a primeira exposição aos objetos (Reibaud *et al.*, 1999). Entretanto os camundongos *knock-out* apresentaram desempenho similar aos camundongos selvagens na aquisição da tarefa espacial do labirinto aquático (Varvel e Lichtman, 2002; Varvel *et al.*, 2005) e na aquisição do CA auditivo (Marsicano *et al.*, 2002), tendo exibido respostas diferentes na extinção de ambos os modelos comportamentais e que serão abordados posteriormente nesta discussão. Comparando as conclusões obtidas com resultados utilizando os antagonistas canabinóides SR141716A e o SR147778 com os dados obtidos em camundongos *knock-out* para os receptores CB1, fica bastante claro que estes receptores estão envolvidos de alguma forma no processo de aquisição de memórias. Contudo, estas evidências não são suficientes para se chegar a uma conclusão definitiva a respeito do envolvimento do sistema endocanabinóide como um todo neste processo. Até o presente momento não existem experimentos que favoreçam ou se contraponham à hipótese de que os endocanabinóides sejam liberados durante o processo de aquisição de memórias, sejam elas aversivas ou não. Ainda assim, especula-se que estes antagonistas canabinóides seriam capazes de promover um efeito facilitador na aquisição de memórias por bloquearem uma possível ativação dos receptores CB1 por níveis “tônicos” de endocanabinóides ou como consequência de sua atividade como agonista inverso

nestes receptores (Pertwee, 2005b). Já que não se dispõe de dados referentes aos efeitos de antagonistas neutros dos receptores CB1 em modelos animais de memória, permanece a incerteza quanto ao verdadeiro papel do sistema endocanabinóide na aquisição de informações e na formação de memórias, sejam elas aversivas ou de natureza diversa.

Após os experimentos de aquisição do CA, fomos verificar as outras etapas do processo de formação de memórias aversivas. Nos experimentos de consolidação não foram verificados efeitos da manipulação do sistema canabinóide sobre esta etapa. A administração do agonista WIN55212-2, como demonstrado na Fig 16, não foi capaz de prejudicar a consolidação de memórias aversivas neste modelo, mesmo na dose de 2,5 mg/kg, que havia prejudicado a aquisição do CA contextual. Da mesma forma, os animais injetados com o antagonista SR147778 apresentaram níveis de congelamento semelhantes ao grupo controle no dia do teste (Fig 17). No entanto, estes resultados contrastam com dados anteriores da literatura e não podem ser utilizados para afirmar categoricamente que o sistema canabinóide não esteja envolvido nesta etapa de formação de memória. Em experimentos anteriores de nosso laboratório, a administração de Δ^9 -THC não foi capaz de prejudicar a consolidação da memória em camundongos avaliados na tarefa de referência espacial (Da Silva e Takahashi, 2002). Da mesma forma, experimentos utilizando a esQUIVA inibitória tipo *step-down* não demonstraram nenhum prejuízo na consolidação da memória com injeção i.p. de Δ^9 -THC (Mishima *et al.*, 2001). Contudo, quando este mesmo agonista foi injetado por via i.c.v., um contundente prejuízo de consolidação foi

observado, demonstrando que há uma relação temporal bastante importante na possibilidade de interferência da agonistas canabinóides na consolidação desta tarefa comportamental (Mishima *et al.*, 2001). Esta descoberta é reforçada por dados de Murillo-Rodrigues *et al.* (1998) e Costanzi *et al.* (2004) demonstrando que a administração i.c.v. de anandamida imediatamente após a etapa de treino da esquiva inibitória também é capaz de prejudicar a consolidação (Murillo-Rodriguez *et al.*, 1998; Costanzi *et al.*, 2004). Curiosamente, estes efeitos da anandamida são abolidos se os animais forem pré-expostos à gaiola de esquiva inibitória 24 h antes de serem condicionados, destacando, como já proposto anteriormente, que uma etapa de integração das informações contextuais orquestrada pelo hipocampo precederia uma etapa de associação do contexto ao componente aversivo da tarefa (Fanselow, 2000; Costanzi *et al.*, 2003). Assim, a etapa de integração das informações contextuais seria realizada durante a pré-exposição à gaiola de condicionamento, evitando o efeito da anandamida i.c.v. sobre a consolidação da memória que, imagina-se, seja sobre esta estrutura cerebral (Murillo-Rodriguez *et al.*, 1998; Costanzi *et al.*, 2003; Costanzi *et al.*, 2004). Assim como o agonista WIN55212-2 não prejudicou a consolidação do CA contextual (Fig 16), em nossos experimentos a administração i.p. do SR147778 imediatamente após o condicionamento não interferiu com os níveis de congelamento expressos pelos animais no dia do teste (Fig 17). No entanto, mais uma vez, estes dados não podem ser utilizados como prova irrefutável de que os endocanabinóides não estejam envolvidos neste processo, pois embora haja experimentos com o labirinto radial de 8 braços corroborando os resultados do presente trabalho (Lichtman, 2000), existe um número considerável de evidências

contrárias (Terranova *et al.*, 1996; Wolff e Leander, 2003; De Oliveira Alvares *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2005). O bloqueio dos receptores CB1 foi capaz de melhorar a consolidação da memória em experimentos i.p. realizados no modelo de reconhecimento social em animais adultos e idosos (Terranova *et al.*, 1996), no labirinto radial de 8 braços (Wolff e Leander, 2003) e no labirinto em “T” elevado (Takahashi *et al.*, 2005), como seria de se esperar baseado em conclusões oriundas dos experimentos com os agonistas. No entanto, uma evidência bastante divergente a estes achados foi recentemente apresentada em estudo realizando administração intra-hipocampal do antagonista AM-251 imediatamente após o treino da tarefa de esquiva inibitória tipo *step-down* (De Oliveira Alvares *et al.*, 2005). Neste experimento, o bloqueio dos receptores canabinóides CB₁ não apresentou efeitos facilitatórios sobre a consolidação da memória da esquiva inibitória. Muito pelo contrário, prejudicou a consolidação desta tarefa. Interessante observar que somente a dose intermediária de AM-251 prejudicou a aquisição da tarefa. Este achado, embora comportamentalmente oposto, coincide com a curva dose-efeito em forma de “U invertido” observada para os efeitos dos antagonistas canabinóides sobre a consolidação (Wolff e Leander, 2003; Takahashi *et al.*, 2005). Diferenças relacionadas à droga utilizada (SR141716A vs AM-251) não devem ser responsáveis pelas diferenças comportamentais observadas, dada a extrema semelhança entre as moléculas (Gatley *et al.*, 1996). Somadas, estas evidências parecem sugerir que mais do que simplesmente “melhorar” ou “piorar” a consolidação da memória, os endocanabinóides devem ter um papel na modulação tônica deste processo, sendo de grande importância que se leve em consideração a relação temporal e o papel específico deste sistema de

neurotransmissão em cada estrutura cerebral avaliada (De Oliveira Alvares *et al.*, 2005).

Após a etapa de consolidação, avaliamos os efeitos da administração do agonista canabinóide WIN55212-2 e do antagonista canabinóide SR147778 antes da re-exposição à gaiola de condicionamento. Não foram verificados efeitos da manipulação do sistema canabinóide sobre a evocação de memórias aversivas avaliadas no modelo animal do CA contextual. Tanto os animais tratados com o agonista WIN55212-2 quanto os animais tratados com o antagonista SR147778 antes do teste realizado 24 h após o CA não apresentaram quaisquer diferenças nos níveis de congelamento expressos durante o teste em relação ao grupo controle (Figs 18 e 19, respectivamente). A grande maioria dos experimentos realizados até agora não demonstraram efeito de agonistas ou antagonistas do sistema canabinóide sobre a evocação de memórias (Frischknecht *et al.*, 1985; Lichtman, 2000; Da Silva e Takahashi, 2002; Marsicano *et al.*, 2002; Varvel e Lichtman, 2002; Chhatwal *et al.*, 2005; Varvel *et al.*, 2005) , assim como os estudos pioneiros com extratos de *Cannabis* em humanos já apontavam nesta mesma direção (Darley *et al.*, 1977; Block e Wittenborn, 1986), o que poderia nos levar a crer que realmente o sistema canabinóide não esteja envolvido na etapa de evocação de memórias. No entanto, Mishima *et al.* (2001) forneceram evidência de que o THC poderia interferir na evocação da esquiva inibitória, diminuindo a clareza na interpretação destes achados e evidenciando a necessidade de estudos mais conclusivos sobre este assunto (Mishima *et al.*, 2001).

Como exposto na Introdução, no momento em que uma memória é evocada, dois processos antagônicos podem ocorrer, a reconsolidação ou a extinção. A reconsolidação tende a reforçar a memória evocada, mantendo ou até aumentando o padrão de resposta comportamental observado durante o teste de evocação; já a extinção tende a enfraquecer a memória evocada, reduzindo a resposta comportamental observada nos testes subsequentes. Então, dada a recente descoberta do envolvimento do sistema endocanabinóide na extinção de memórias aversivas, passamos a estudar esta etapa da memória no modelo do CA contextual.

Primeiramente, os resultados da administração do antagonista canabinóide SR147778 previamente a cada uma das sessões de extinção demonstraram que o bloqueio dos receptores canabinóides tipo CB1 prejudica a extinção do CA contextual em ratos submetidos ao protocolo de extinção 24 h após o condicionamento (Fig 21). Estes resultados estão de acordo com os do recente estudo demonstrando que tanto animais *knock-out* para o receptor CB1 quanto animais tratados com o antagonista canabinóide CB1 SR141716A apresentaram um enfático prejuízo na extinção do medo condicionado (Marsicano *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2004; Chhatwal *et al.*, 2005). Além de demonstrarem farmacologicamente e geneticamente a participação dos receptores canabinóides CB1 na extinção do CA, Marsicano *et al.* (2002) demonstraram com experimento de microdiálise a participação dos ligantes canabinóides endógenos na extinção de memórias aversivas, já que durante o protocolo de extinção ambos os endocanabinóides anandamida e o 2-AG são liberados em uma sub-região da amígdala denominada de amígdala basolateral (Marsicano *et al.*, 2002). Esta

região esta intensamente envolvida com o processamento de informações emocionais neste modelo comportamental e estima-se que alterações de plasticidade sináptica na amígdala basolateral estejam envolvidos com os processos de aquisição e extinção de memórias aversivas (Maren, 2001). Recentemente, experimentos de analgesia induzida pelo estresse demonstraram a liberação de endocanabinóides na substância cinzenta periaquedutal imediatamente após um evento estressor (Hohmann *et al.*, 2005), sugerindo que provavelmente a liberação de endocanabinóides durante a apresentação de um EC previamente pareado com um choque não significa uma resposta exclusiva de processos mnemônicos, mas sim uma resposta orquestrada do organismo a uma situação de perigo. Esta liberação fisiológica de endocanabinóides durante a extinção vem ao encontro de nossos resultados demonstrando que a administração de uma baixa dose (0,25 mg/kg, i.p.) do agonista canabinóide WIN55212-2 facilita a extinção do CA contextual em ratos (Fig 20). Nossos resultados contrastam diretamente com os resultados de Chhatwal *et al.* (2005) que não demonstraram uma facilitação da extinção do medo condicionado após o tratamento i.p. com o mesmo agonista canabinóide em ratos avaliados no modelo do sobressalto acústico potencializado pelo medo (Chhatwal *et al.*, 2005). Contudo, naquele estudo os autores optaram por utilizar altas doses de WIN55212-2 (5,0 mg/kg, i.p.), assim como utilizaram um outro modelo de CA, o que pode explicar a aparente discrepância com os resultados apresentados no presente estudo. Além do mais, nossos resultados usando doses altas do agonista canabinóide (1,25 – 2,5 mg/kg, i.p.) também não demonstraram um efeito facilitatório na extinção do CA contextual, inclusive com a dose maior tendo

causado um prejuízo na extinção (Fig 20). Aparentemente, este achado se encaixa perfeitamente com os resultados anteriores do experimento de aquisição, demonstrando que doses altas de WIN55212-2 podem prejudicar a aquisição do CA contextual (Fig 14), já que a extinção se trata de um processo de reaprendizado emocional ao invés de um simples esquecimento observado em outros protocolos experimentais (Berman e Dudai, 2001; Suzuki *et al.*, 2004; Cammarota *et al.*, 2005). Uma outra opção, sugerida no artigo de Chattwal *et al.* (2005) para justificar a ausência de efeito facilitatório do WIN55212-2 na extinção do sobressalto acústico potencializado pelo medo, seria que as doses mais altas do agonista levariam a uma rápida *down-regulation* ou taquifilaxia dos receptores CB₁, diminuindo conseqüentemente a eficácia da transmissão canabinóide e resultando em um reduzido efeito fisiológico final (Mato *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 1999).

A relação inversa no efeito dose-resposta de agonistas canabinóides observada no experimento de extinção do CA contextual também pode ser encontrada em outros modelos de comportamento defensivo/ansiedade. Em geral, baixas doses tendem a ser ansiolíticas, enquanto altas doses tendem a ser ansiogênicas, embora estes efeitos possam ser influenciados pelas experiências prévias do indivíduo e pelo contexto ambiental (Hill and Gorzalka, 2004; Viveros *et al.*, 2005). Uma possível explicação para os efeitos bidirecionais do WIN55212-2 observados no experimento de extinção do CA contextual poderia ser que na dose mais baixa (0,25 mg/kg, i.p.) um efeito ansiolítico contribuiria para uma redução na expressão do congelamento e que na dose mais alta (2,5 mg/kg, i.p.), algum efeito ansiogênico da droga poderia exacerbar a experiência aversiva de ser re-exposto

à gaiola de condicionamento, contribuindo para a expressão do congelamento nesta situação. Um ponto importante nesta discussão é o fato de que o nível de congelamento apresentado pelos animais tratados com a dose mais baixa do agonista apresentou-se reduzido já na primeira sessão, comparado ao grupo controle (Fig 20). A fim de verificar se este efeito estaria relacionado a uma facilitação na extinção durante a primeira sessão (extinção de curto prazo), a um prejuízo de evocação do CA ou a uma redução na expressão do comportamento de congelamento, foi realizada uma análise separada dos dados da primeira sessão, divididos em blocos de 3 min (Fig 20). A análise estatística destes dados demonstrou que apenas no segundo e terceiro blocos de 3 min houve uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, o que é compatível com a idéia de que o tratamento com uma dose baixa do agonista canabinóide provocou a facilitação da extinção de curto (durante a sessão) e de longo prazo (entre as sessões). Além disso, os resultados do experimento de evocação já indicavam que esta dose de WIN55212-2 não seria capaz de prejudicar a evocação do CA contextual (Fig 18).

Apesar de ter ficado bastante claro que os efeitos do agonista canabinóide sobre a extinção de memórias aversivas não se dá por uma redução generalizada na expressão do comportamento de congelamento; e já que os canabinóides possuem um efeito bastante curioso sobre os comportamentos ligados à ansiedade (Onaivi et al., 1990; Arevalo et al., 2001; Genn et al., 2003, 2004; Takahashi et al., 2003; Tournier et al., 2003; Haller et al., 2004; Viveros et al., 2005); foram avaliados os efeitos do agonista WIN55212-2 (0,25 mg/kg, i.p.) em ratos testados no modelo do LCE potencializado pelo medo. Este modelo permite,

além de observar possíveis efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos da droga, a observação de um possível efeito da droga nos níveis de comportamento tipo ansiedade provocada pela evocação de uma memória aversiva. A despeito de evidências anteriores descreverem um efeito ansiolítico para baixas doses de agonistas canabinóides (Onaivi et al., 1990; Berrendero and Maldonado, 2002; Genn et al., 2003; Marco et al., 2004), este experimento utilizando o LCE potencializado pelo medo indica que o efeito facilitatório do WIN55212-2 sobre a extinção do CA contextual não está diretamente relacionado a um efeito ansiolítico desta droga, já que o tratamento não alterou o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos para os animais “naive”, nem para os animais re-expostos à gaiola de condicionamento previamente à exposição no LCE ou para os animais que receberam um choque nas patas no dia anterior ao teste mas não foram re-expostos à gaiola de condicionamento (Tabela 3). Contudo, considerando que o comportamento de congelamento poderia ser mais sensível ao efeito de ansiolíticos do que o comportamento de esquiva observado no LCE, a possibilidade de que haja alguma contribuição de efeito ansiolítico no efeito do WIN55212-2 sobre a extinção do CA não pode ser inteiramente desconsiderada. Curiosamente, neste experimento, somente os animais que receberam choque nas patas 24 h antes da exposição ao LCE, apresentaram uma redução no número de entradas nos braços abertos em comparação ao controle, quando se poderia esperar que também os animais que foram submetidos ao CA contextual e re-expostos à gaiola de condicionamento antes de serem colocados no LCE também apresentariam este comportamento tipo ansiogênico. É interessante observar, no entanto, que ambos os grupos citados apresentaram uma redução no

número de entradas nos braços fechados do labirinto (parâmetro locomotor), levantando o questionamento de que talvez esta aparente redução da locomoção no LCE poderia estar relacionada à permanência dos animais em uma posição de imobilidade devida à expressão de comportamento de congelamento durante a avaliação no LCE. Talvez se fosse realizada uma análise mais completa do comportamento dos animais no LCE, considerando outros parâmetros etológicos ou o fator temporal, como sugerido por Carobrez e Bertoglio (2005) , as conclusões a respeito do efeito do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre os comportamentos tipo ansiedade observados no LCE após a evocação de memórias aversivas poderiam ter sido diferentes.

Como próximo passo, investigamos a participação do sistema canabinóide na extinção de memórias aversivas antigas em ratos. Como previamente demonstrado por Suzuki et al. (2004), as memórias aversivas antigas se tornam mais resistentes à extinção quanto maior for o intervalo entre o condicionamento e o início da sessão de extinção. No presente estudo, os animais foram submetidos ao CA contextual e 30 dias após iniciaram-se as sessões de extinção. Os níveis de congelamento apresentados pelos animais condicionados 30 dias antes da extinção foram comparáveis aos dos animais condicionados apenas 24 h antes das sessões de extinção, mas 5 sessões (ao invés de três) foram necessárias para que os animais do grupo controle apresentassem uma extinção parcial do comportamento condicionado de congelamento (Fig 25). É interessante notar quão duradoura pode ser a retenção de uma memória aversiva, provavelmente pelo fato de um evento desta natureza ser de grande importância do ponto de vista biológico de sobrevivência do animal. Na verdade já havia sido descrito

anteriormente que memórias de natureza aversiva podiam durar semanas, meses ou até mesmo anos (Izquierdo *et al.*, 1998). Contudo, a possibilidade de se intervir farmacologicamente na integridade de memórias já consolidadas foi raramente abordada. Nader *et al.* (2000), em um experimento muito interessante, demonstraram que a evocação do CA faz com que a memória aversiva se torne lábil e que a síntese de novas proteínas seria necessária para sua reconsolidação. Desta forma, administrando anisomicina, um inibidor da síntese de proteínas, imediatamente após a etapa de evocação do CA os autores interferiram com a reconsolidação desta memória, demonstrando a fragilidade deste processo. A capacidade de se realizar esta interferência farmacológica mesmo em memórias “antigas” (no referido estudo o intervalo entre o CA e o teste foi de 14 dias) serviu de inspiração para o protocolo desenvolvido no presente trabalho. Neste experimento conduzido em animais condicionados 30 dias antes das sessões de extinção a administração da dose baixa do agonista canabinóide WIN55212-2 também se mostrou capaz de facilitar a extinção de memórias antigas e este efeito foi prevenido pela administração do antagonista seletivo para os receptores canabinóides CB₁ em uma dose que *per se* não provoca efeito sobre o processo de extinção do CA contextual (Fig 25). Estes dados demonstram de maneira muito interessante que a estratégia de ativar os receptores CB₁, utilizada para facilitar a extinção de memórias aversivas recentes (24 h), pode também ser utilizada na extinção de memórias aversivas antigas. Uma outra parte deste experimento se destinou a verificar se os efeitos do agonista canabinóide seriam restritos às memórias que foram submetidas ao processo de extinção ou se ele poderia interferir também com outras memórias que não haviam sido “intencionalmente”

evocadas (Fig 24B). Por este motivo, os animais haviam sido condicionados simultaneamente a ambos, som e contexto, mas submetidos à extinção somente do CA contextual. Após as 5 sessões de extinção os animais foram colocados em um novo ambiente, uma caixa de acrílico transparente, e testados na ausência de tratamento farmacológico para a evocação do CA auditivo. De maneira impressionante, ambos os animais que haviam sido tratados com WIN55212-2 e os animais controle apresentaram níveis similares de congelamento durante a exposição ao som previamente condicionado ao choque, demonstrando a especificidade dos efeitos do agonista canabinóide em facilitar a extinção de memórias evocadas, mantendo intacta outras memórias dos animais tratados (Fig 25B). Além disso, um dia após o teste de evocação do CA auditivo, os animais foram testados, também na ausência de tratamento farmacológico, para a evocação do CA contextual. Surpreendentemente os animais previamente tratados com WIN55212-2 durante as sessões de extinção demonstraram níveis reduzidos de congelamento comparados ao grupo controle, demonstrando enfaticamente os efeitos a longo prazo da administração deste agonista canabinóide. Desnecessário mencionar, o grupo previamente tratado com o antagonista canabinóide SR147778 apresentou níveis de congelamento similares aos do grupo controle (Fig 25B). Então, analisando todo o conjunto de dados sobre os efeitos da manipulação do sistema canabinóide sobre a extinção de memórias aversivas podemos afirmar que a ativação exógena do sistema canabinóide resulta em um efeito facilitatório da extinção para memórias aversivas recentes e antigas, com conseqüências duradouras, e sem provocar um efeito

generalizado de extinção ou “apagamento” de memórias que não tenham sido evocadas no momento do teste.

Além do mais, nossos resultados nos permitem afirmar que os efeitos da manipulação do sistema canabinóide sobre a extinção de memórias não se restringe ao modelo do CA contextual, uma vez que resultados semelhantes foram observados nos animais tratados com WIN55212-2 (0,25 mg/kg, i.p.) ou SR147778 (1,0 mg/kg, i.p.) e avaliados na tarefa reversa do labirinto aquático (Fig 27). Neste experimento, identicamente ao que ocorreu no experimento de extinção do CA, o bloqueio dos receptores canabinóides CB₁ prejudicou a extinção da memória espacial relacionada à posição original da plataforma, enquanto a ativação exógena destes mesmos receptores facilitou a extinção desta memória, contribuindo para a mudança comportamental em busca da nova localização da plataforma submersa (Fig 27). Os resultados com o antagonista estão de acordo com resultados prévios que demonstraram prejuízo na extinção de informação espacial previamente adquirida em camundongos *knock-out* para os receptores canabinóides CB₁ ou nos respectivos camundongos selvagens tratados com o antagonista canabinóide SR141716A (Varvel e Lichtman, 2002; Varvel *et al.*, 2005). É importante mencionar que, embora não se tenha dúvidas a respeito do envolvimento do sistema endocanabinóide na extinção do medo condicionado e de informação espacial avaliada na tarefa reversa do labirinto aquático, conclusões sobre a participação deste sistema de neurotransmissão na modulação da extinção de memórias com motivação apetitiva ainda se mantém obscuras. Recentemente Hölter *et al* (2005) sugeriram em estudo utilizando animais *knock-out*, que os receptores canabinóides CB₁ não seriam

indispensáveis na extinção do comportamento operante para a obtenção de alimento, uma tarefa cognitiva evidentemente ligada a motivações apetitivas (Holter *et al.*, 2005). Contudo, numa abordagem semelhante à utilizada em nosso estudo, Parker *et al.* (2004) demonstraram que baixas doses de Δ^9 -THC poderiam ser capazes de facilitar a extinção da preferência condicionada de lugar para cocaína e anfetamina, uma tarefa cuja motivação hedônica é também certamente de origem apetitiva (Parker *et al.*, 2004). Então, apesar de diversas evidências terem sido apresentadas sobre a participação do sistema canabinóide no processo de extinção de memórias, diferentes mecanismos celulares e moleculares devem estar envolvidos na extinção de memórias de natureza distintas, garantindo que este assunto ainda se manterá em discussão até que evidências conclusivas sobre a sua participação durante a exposição a eventos estressores ou a lembrança de experiências vividas sejam apresentadas.

Uma idéia interessante que tem surgido a respeito dos canabinóides e experiências aversivas é que o sistema endocanabinóide poderia estar envolvido na adaptação de organismos ao estresse (Carsten Wotjak, comunicação pessoal). Esta hipótese tem sido formulada com base no fato de que: 1) há uma ativação súbita e maciça deste sistema durante a exposição a um estressor (Hohmann *et al.*, 2005), onde o sistema endocanabinóide poderia atuar “preparando” o organismo para uma possível situação de confronto ou fuga (e.g. como o efeito analgésico); 2) pela igualmente súbita e maciça liberação de endocanabinóides durante a recordação de experiências aversivas (Marsicano *et al.*, 2002), na qual os endocanabinóides poderiam hipoteticamente contribuir na reorganização de

uma estratégia comportamental em resposta ao estressor (como na extinção do CA); e 3) pela observação de que os receptores canabinóides são importantes para a expressão do comportamento de imobilidade em camundongos avaliados no teste da natação forçada (Shearman *et al.*, 2003) e no estresse da contenção (Patel *et al.*, 2005), evidência que, embora seja comumente interpretada como um indício de comportamento tipo depressivo, poderia também ser encarada como um indício de que o sistema canabinóide participe da organização de uma resposta comportamental passiva de adaptação a estes estressores.

Concluindo, o presente trabalho avaliou de uma maneira geral os efeitos da manipulação farmacológica do sistema canabinóide sobre as etapas de aquisição, consolidação, evocação e extinção do condicionamento aversivo em ratos, utilizado como um modelo animal para o estudo de memórias com motivação aversiva. Os resultados demonstraram claramente que a ativação dos receptores canabinóides CB₁ proporciona um prejuízo na aquisição e uma facilitação da extinção destas memórias, especialmente em se tratando do condicionamento aversivo contextual, que envolve processamento hipocampal e se constitui de uma representação integrada de diversas pistas ambientais de natureza multisensorial. Estas duas etapas da memória parecem constituir dois pontos importantes para terapias farmacológicas que visem interferir com a formação ou expressão de respostas de medo condicionado visando à melhoria de sintomas de ansiedade em patologias desta natureza. Como se sabe, a extinção de memórias aversivas em animais se trata de um procedimento experimental análogo ao realizado durante a terapia cognitivo-comportamental, realizada com sucesso em seres humanos para a redução gradual de respostas de ansiedade frente ao motivo

gerador de um trauma; contribuindo, por exemplo, para o tratamento de fobias e do estresse pós-traumático (Rothbaum e Schwartz, 2002). Já que se têm evidências de que uma terapia farmacológica que facilite a extinção do condicionamento aversivo em animais pode também ser utilizada com sucesso para o tratamento das mencionadas patologias em seres humanos (Walker et al, 2002; Ressler et al., 2004), sugere-se a possibilidade de que uma farmacoterapia tendo como alvo o sistema canabinóide de neurotransmissão poderia representar uma nova abordagem terapêutica para patologias de ansiedade relacionadas à lembrança de eventos traumáticos.

CONCLUSÕES

- A ativação dos receptores canabinóides CB1 pelo agonista WIN55212-2 prejudica a aquisição de memórias aversivas no condicionamento aversivo contextual em ratos. Por outro lado o bloqueio dos receptores CB1 pelo antagonista SR147778, pelo menos nas doses e esquema de tratamento utilizados no presente estudo, não interferiu na aquisição do condicionamento aversivo contextual.
- As etapas de consolidação e evocação de memórias aversivas no condicionamento aversivo contextual não foram influenciadas pelo tratamento com o agonista canabinóide WIN55212-2 ou com o antagonista canabinóide SR147778, pelo menos nas doses e esquema de tratamento utilizados no presente estudo.
- A extinção de memórias aversivas no condicionamento aversivo contextual foi facilitada pelo tratamento com dose baixa do agonista canabinóide WIN55212-2 e dificultada pelo tratamento com dose alta do mesmo agonista. Por outro lado, o bloqueio dos receptores canabinóides CB1 pelo antagonista SR147778 bloqueou a extinção do condicionamento aversivo contextual.

- O tratamento com o agonista canabinóide WIN55212-2 foi capaz de facilitar tanto a extinção de memórias aversivas recentes (1 dia) quanto a extinção de memórias aversivas antigas (30 dias) de uma maneira dependente da ativação de receptores canabinóides CB1. Estes efeitos foram persistentes e específicos para a memória que sofreu processo de extinção.
- Aparentemente os efeitos do WIN não estão relacionadas a alterações motoras ou de comportamentos tipo ansiedade avaliados no modelo do labirinto em cruz elevado potencializado pelo medo.
- O tratamento com o agonista canabinóide WIN55212-2 e com o antagonista canabinóide SR147778 facilitou e prejudicou, respectivamente, o desempenho dos animais na tarefa reversa do labirinto aquático, demonstrando que os efeitos da manipulação do sistema canabinóide não se restringem à extinção de memórias aversivas no condicionamento aversivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel, E. L. **Marihuana: The First Twelve Thousand Years**. New York: Plenum Press. 1980

Annis, H. M. e Smart, R. G. Adverse reactions and recurrences from marihuana use. **Br J Addict Alcohol Other Drugs**, v.68, n.4, Dec, p.315-319. 1973.

Baker, D., Pryce, G., Croxford, J. L., Brown, P., Pertwee, R. G., Huffman, J. W. e Layward, L. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. **Nature**, v.404, n.6773, Mar 2, p.84-87. 2000.

Baker, D., Pryce, G., Giovannoni, G. e Thompson, A. J. The therapeutic potential of cannabis. **Lancet Neurol**, v.2, n.5, May, p.291-298. 2003.

Barros, D. M., Carlis, V., Maidana, M., Silva, E. S., Baisch, A. L., Ramirez, M. R. e Izquierdo, I. Interactions between anandamide-induced anterograde amnesia and post-training memory modulatory systems. **Brain Res**, v.1016, n.1, Jul 30, p.66-71. 2004.

Bellville, J. W., Gasser, J. C., Miyake, T. e Aqleh, K. Tolerance to the respiratory effects of marijuana in man. **J Pharmacol Exp Ther**, v.197, n.2, May, p.326-331. 1976.

Beltramo, M., Di Tomaso, E. e Piomelli, D. Inhibition of anandamide hydrolysis in rat brain tissue by (E)-6-(bromomethylene) tetrahydro-3-(1-naphthalenyl)-2H-pyran-2-one. **FEBS Lett**, v.403, n.3, Feb 24, p.263-267. 1997a.

Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A. e Piomelli, D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. **Science**, v.277, n.5329, Aug 22, p.1094-1097. 1997b.

Bensusan, A. D. Marihuana withdrawal symptoms. **Br Med J**, v.3, n.766, Jul 10, p.112. 1971.

Berman, D. E. e Dudai, Y. Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. **Science**, v.291, n.5512, Mar 23, p.2417-2419. 2001.

Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Valverde, O., Otto, M., Michel, K., Sarstre, M. e Zimmer, A. Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.43, Oct 25, p.15670-15675. 2005.

Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J. A., Fernandez-Ruiz, J. J. e Di Marzo, V. Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. **Biochem Biophys Res Commun**, v.256, n.2, Mar 16, p.377-380. 1999.

Bisogno, T., Melck, D., Bobrov, M., Gretskaya, N. M., Bezuglov, V. V., De Petrocellis, L. e Di Marzo, V. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. **Biochem J**, v.351 Pt 3, Nov 1, p.817-824. 2000.

Bisogno, T., Ligresti, A. e Di Marzo, V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. **Pharmacol Biochem Behav**, v.81, n.2, Jun, p.224-238. 2005.

Blanchard, R. J. e Blanchard, D. C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **J Comp Physiol Psychol**, v.68, n.1, May, p.129-135. 1969.

Block, R. I. e Wittenborn, J. R. Marijuana effects on the speed of memory retrieval in the letter-matching task. **Int J Addict**, v.21, n.2, Feb, p.281-285. 1986.

Borsini, F., Podhorna, J. e Marazziti, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology (Berl)**, v.163, n.2, Sep, p.121-141. 2002.

Bouaboula, M., Rinaldi, M., Carayon, P., Carillon, C., Delpech, B., Shire, D., Le Fur, G. e Casellas, P. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. **Eur J Biochem**, v.214, n.1, May 15, p.173-180. 1993.

Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G. e Casellas, P. Activation of mitogen-activated protein

kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. **Biochem J**, v.312 (Pt 2), Dec 1, p.637-641. 1995.

Brewin, C. R. e Holmes, E. A. Psychological theories of posttraumatic stress disorder. **Clin Psychol Rev**, v.23, n.3, May, p.339-376. 2003.

Brodkin, J. e Moerschbaecher, J. M. SR141716A antagonizes the disruptive effects of cannabinoid ligands on learning in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v.282, n.3, Sep, p.1526-1532. 1997.

Buckley, N. E., Hansson, S., Harta, G. e Mezey, E. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. **Neuroscience**, v.82, n.4, Feb, p.1131-1149. 1998.

Calignano, A., Katona, I., Desarnaud, F., Giuffrida, A., La Rana, G., Mackie, K., Freund, T. F. e Piomelli, D. Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. **Nature**, v.408, n.6808, Nov 2, p.96-101. 2000.

Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Barros, D. M., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Medina, J. H. e Izquierdo, I. Retrieval and the extinction of memory. **Cell Mol Neurobiol**, v.25, n.3-4, Jun, p.465-474. 2005.

Cannich, A., Wotjak, C. T., Kamprath, K., Hermann, H., Lutz, B. e Marsicano, G. CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. **Learn Mem**, v.11, n.5, Sep-Oct, p.625-632. 2004.

Carlini, E. A. The good and the bad effects of (-) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (Delta 9-THC) on humans. **Toxicol**, v.44, n.4, Sep 15, p.461-467. 2004.

Carlisle, S. J., Marciano-Cabral, F., Staab, A., Ludwick, C. e Cabral, G. A. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. **Int Immunopharmacol**, v.2, n.1, Jan, p.69-82. 2002.

Carobrez, A. P. e Bertoglio, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev**, v.29, n.8, p.1193-1205. 2005.

Chalsma, A. L. e Boyurn, D. **Marijuana Situation Assesment**. Washington D.C.: Office of National Drug Control Policy. 1994

Chhatwal, J. P., Davis, M., Maguschak, K. A. e Ressler, K. J. Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**, v.30, n.3, Mar, p.516-524. 2005.

Childers, S. R. e Breivogel, C. S. Cannabis and endogenous cannabinoid systems. **Drug Alcohol Depend**, v.51, n.1-2, Jun-Jul, p.173-187. 1998.

Colombo, G., Agabio, R., Diaz, G., Lobina, C., Reali, R. e Gessa, G. L. Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. **Life Sci**, v.63, n.8, p.PL113-117. 1998.

Consroe, P., Musty, R., Rein, J., Tillery, W. e Pertwee, R. The perceived effects of smoked cannabis on patients with multiple sclerosis. **Eur Neurol**, v.38, n.1, p.44-48. 1997.

Costanzi, M., Battaglia, M., Populin, R., Cestari, V. e Castellano, C. Anandamide and memory in CD1 mice: effects of immobilization stress and of prior experience. **Neurobiol Learn Mem**, v.79, n.3, May, p.204-211. 2003.

Costanzi, M., Battaglia, M., Rossi-Arnaud, C., Cestari, V. e Castellano, C. Effects of anandamide and morphine combinations on memory consolidation in cd1 mice: involvement of dopaminergic mechanisms. **Neurobiol Learn Mem**, v.81, n.2, Mar, p.144-149. 2004.

Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A. e Gilula, N. B. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. **Nature**, v.384, n.6604, Nov 7, p.83-87. 1996.

Cruz, A. P., Frei, F. e Graeff, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v.49, n.1, Sep, p.171-176. 1994.

Curran, H. V., Brignell, C., Fletcher, S., Middleton, P. e Henry, J. Cognitive and subjective dose-response effects of acute oral Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) in infrequent cannabis users. **Psychopharmacology (Berl)**, v.164, n.1, Oct, p.61-70. 2002.

Da Silva, G. E. e Takahashi, R. N. SR 141716A prevents delta 9-tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a Morris-type water maze in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.26, n.2, Feb, p.321-325. 2002.

Darley, C. F., Tinklenberg, J. R., Roth, W. T., Vernon, S. e Kopell, B. S. Marijuana effects on long-term memory assessment and retrieval. **Psychopharmacology (Berl)**, v.52, n.3, May 9, p.239-241. 1977.

Darmani, N. A. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR 141716A reverses the antiemetic and motor depressant actions of WIN 55, 212-2. **Eur J Pharmacol**, v.430, n.1, Oct 26, p.49-58. 2001.

Davies, S. N., Pertwee, R. G. e Riedel, G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. **Neuropharmacology**, v.42, n.8, Jun, p.993-1007. 2002.

De Oliveira Alvares, L., De Oliveira, L. F., Camboim, C., Diehl, F., Genro, B. P., LANZIOTTI, V. B. e Quillfeldt, J. A. Amnesic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. **Neurobiol Learn Mem**, v.83, n.2, Mar, p.119-124. 2005.

Despres, J. P., Golay, A. e Sjostrom, L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. **N Engl J Med**, v.353, n.20, Nov 17, p.2121-2134. 2005.

Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S. e Howlett, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Mol Pharmacol**, v.34, n.5, Nov, p.605-613. 1988.

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. e Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v.258, n.5090, Dec 18, p.1946-1949. 1992.

Dewey, W. L. Cannabinoid pharmacology. **Pharmacol Rev**, v.38, n.2, Jun, p.151-178. 1986.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C. e Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature**, v.372, n.6507, Dec 15, p.686-691. 1994.

Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T. e De Petrocellis, L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. **Trends Neurosci**, v.21, n.12, Dec, p.521-528. 1998.

Egashira, N., Mishima, K., Iwasaki, K. e Fujiwara, M. Intracerebral microinjections of delta 9-tetrahydrocannabinol: search for the impairment of spatial memory in the eight-arm radial maze in rats. **Brain Res**, v.952, n.2, Oct 18, p.239-245. 2002.

Fanselow, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. **Pavlov J Biol Sci**, v.15, n.4, Oct-Dec, p.177-182. 1980.

Fanselow, M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behav Brain Res**, v.110, n.1-2, Jun 1, p.73-81. 2000.

Felder, C. C., Briley, E. M., Axelrod, J., Simpson, J. T., Mackie, K. e Devane, W. A. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.16, Aug 15, p.7656-7660. 1993.

Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Glass, M., Mackie, K. P., Fahey, K. J., Cullinan, G. J., Hunden, D. C., Johnson, D. W., Chaney, M. O., Koppel, G. A. e Brownstein, M. LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. **J Pharmacol Exp Ther**, v.284, n.1, Jan, p.291-297. 1998.

Ferrari, F., Ottani, A., Vivoli, R. e Giuliani, D. Learning impairment produced in rats by the cannabinoid agonist HU 210 in a water-maze task. **Pharmacol Biochem Behav**, v.64, n.3, Nov, p.555-561. 1999.

Ferreira, T. L., Moreira, K. M., Ikeda, D. C., Bueno, O. F. e Oliveira, M. G. Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. **Brain Res**, v.987, n.1, Oct 10, p.17-24. 2003.

Frischknecht, H. R., Siegfried, B., Schiller, M. e Waser, P. G. Hashish extract impairs retention of defeat-induced submissive behavior in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.86, n.3, p.270-273. 1985.

Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G. e Casellas, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. **Eur J Biochem**, v.232, n.1, Aug 15, p.54-61. 1995.

Gaoni, Y. e Mechoulam, R. Isolation, structure , and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of American Chemistry Society**, v.86, p.1646-1647. 1964.

Gatley, S. J., Gifford, A. N., Volkow, N. D., Lan, R. e Makriyannis, A. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. **Eur J Pharmacol**, v.307, n.3, Jul 4, p.331-338. 1996.

Gebremedhin, D., Lange, A. R., Campbell, W. B., Hillard, C. J. e Harder, D. R. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. **Am J Physiol**, v.276, n.6 Pt 2, Jun, p.H2085-2093. 1999.

Gessa, G. L., Serra, S., Vacca, G., Carai, M. A. e Colombo, G. Suppressing effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR147778, on alcohol intake and motivational properties of alcohol in alcohol-preferring sP rats. **Alcohol Alcohol**, v.40, n.1, Jan-Feb, p.46-53. 2005.

Giuffrida, A., Parsons, L. H., Kerr, T. M., Rodriguez De Fonseca, F., Navarro, M. e Piomelli, D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. **Nat Neurosci**, v.2, n.4, Apr, p.358-363. 1999.

Goparaju, S. K., Ueda, N., Taniguchi, K. e Yamamoto, S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. **Biochem Pharmacol**, v.57, n.4, Feb 15, p.417-423. 1999.

Greenamyre, J. T., Young, A. B. e Penney, J. B. Quantitative autoradiographic distribution of L-[3H]glutamate-binding sites in rat central nervous system. **J Neurosci**, v.4, n.8, Aug, p.2133-2144. 1984.

Hajos, N., Katona, I., Naiem, S. S., Mackie, K., Ledent, C., Mody, I. e Freund, T. F. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. **Eur J Neurosci**, v.12, n.9, Sep, p.3239-3249. 2000.

Haller, J., Varga, B., Ledent, C. e Freund, T. F. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. **Behav Pharmacol**, v.15, n.4, Jul, p.299-304. 2004.

Hampson, R. E., Simeral, J. D., Kelly, E. J. e Deadwyler, S. A. Tolerance to the memory disruptive effects of cannabinoids involves adaptation by hippocampal neurons. **Hippocampus**, v.13, n.5, p.543-556. 2003.

Hanus, L., Breuer, A., Tchilibon, S., Shiloah, S., Goldenberg, D., Horowitz, M., Pertwee, R. G., Ross, R. A., Mechoulam, R. e Fride, E. HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.25, Dec 7, p.14228-14233. 1999.

Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I. e Mechoulam, R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.7, Mar 27, p.3662-3665. 2001.

Heishman, S. J., Arasteh, K. e Stitzer, M. L. Comparative effects of alcohol and marijuana on mood, memory, and performance. **Pharmacol Biochem Behav**, v.58, n.1, Sep, p.93-101. 1997.

Henry, D. J. e Chavkin, C. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. **Neurosci Lett**, v.186, n.2-3, Feb 17, p.91-94. 1995.

Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., De Costa, B. R. e Rice, K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.5, Mar, p.1932-1936. 1990.

Hill, M. N. e Gorzalka, B. B. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.15, n.6, Dec, p.593-599. 2005a.

Hill, M. N. e Gorzalka, B. B. Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? **Behav Pharmacol**, v.16, n.5-6, Sep, p.333-352. 2005b.

Hillard, C. J., Harris, R. A. e Bloom, A. S. Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. **J Pharmacol Exp Ther**, v.232, n.3, Mar, p.579-588. 1985.

Hillard, C. J. e Campbell, W. B. Biochemistry and pharmacology of arachidonylethanolamide, a putative endogenous cannabinoid. **J Lipid Res**, v.38, n.12, Dec, p.2383-2398. 1997.

Hoffman, A. F. e Lupica, C. R. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. **J Neurosci**, v.20, n.7, Apr 1, p.2470-2479. 2000.

Hohmann, A. G. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. **Chem Phys Lipids**, v.121, n.1-2, Dec 31, p.173-190. 2002.

Hohmann, A. G., Suplita, R. L., Bolton, N. M., Neely, M. H., Fegley, D., Mangieri, R., Krey, J. F., Walker, J. M., Holmes, P. V., Crystal, J. D., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G. e Piomelli, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, v.435, n.7045, Jun 23, p.1108-1112. 2005.

Hollister, L. E. Health aspects of cannabis. **Pharmacol Rev**, v.38, n.1, Mar, p.1-20. 1986.

Holter, S. M., Kallnik, M., Wurst, W., Marsicano, G., Lutz, B. e Wotjak, C. T. Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively-motivated learning task. **Eur J Pharmacol**, v.510, n.1-2, Mar 7, p.69-74. 2005.

Howlett, A. C. e Fleming, R. M. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. **Mol Pharmacol**, v.26, n.3, Nov, p.532-538. 1984.

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R. e Pertwee,

R. G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol Rev**, v.54, n.2, Jun, p.161-202. 2002.

Izquierdo, I., Wyrwicka, W., Sierra, G. e Segundo, J. P. [Establishment of a trace reflex during natural sleep of cats]. **Actual Neurophysiol (Paris)**, v.6, p.277-296. 1965.

Izquierdo, I., Netto, C. A., Dalmaz, C., Chaves, M. L., Pereira, M. E. e Siegfried, B. Construction and reconstruction of memories. **Braz J Med Biol Res**, v.21, n.1, p.9-25. 1988.

Izquierdo, I., Barcik, N. R. e Brioni, J. D. Pretest beta-endorphin and epinephrine, but not oxotremorine, reverse retrograde interference of a conditioned emotional response in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v.33, n.3, Jul, p.545-548. 1989.

Izquierdo, I. e Medina, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, v.68, n.3, Nov, p.285-316. 1997.

Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello E Souza, T., De Souza, M. M., Izquierdo, L. A. e Medina, J. H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v.393, n.6686, Jun 18, p.635-636. 1998.

Jagerovic, N., Hernandez-Folgado, L., Alkorta, I., Goya, P., Navarro, M., Serrano, A., Rodriguez De Fonseca, F., Dannert, M. T., Alsasua, A., Suardiaz, M., Pascual, D. e Martin, M. I. Discovery of 5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-hexyl-1h-1,2,4-triazole, a novel in vivo cannabinoid antagonist containing a 1,2,4-triazole motif. **J Med Chem**, v.47, n.11, May 20, p.2939-2942. 2004.

Jarvinen, T., Pate, D. W. e Laine, K. Cannabinoids in the treatment of glaucoma. **Pharmacol Ther**, v.95, n.2, Aug, p.203-220. 2002.

Karniol, I. G. e Carlini, E. A. Comparative studies in man and in laboratory animals on 8 - and 9 -trans-tetrahydrocannabinol. **Pharmacology**, v.9, n.2, p.115-126. 1973.

Katona, I., Sperlagh, B., Magloczky, Z., Santha, E., Kofalvi, A., Czirjak, S., Mackie, K., Vizi, E. S. e Freund, T. F. GABAergic interneurons are the targets of

cannabinoid actions in the human hippocampus. **Neuroscience**, v.100, n.4, p.797-804. 2000.

Kim, D. e Thayer, S. A. Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. **J Neurosci**, v.21, n.10, May 15, p.RC146. 2001.

Kim, J. J. e Fanselow, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v.256, n.5057, May 1, p.675-677. 1992.

Lane, S. D., Cherek, D. R., Lieving, L. M. e Tcheremissine, O. V. Marijuana effects on human forgetting functions. **J Exp Anal Behav**, v.83, n.1, Jan, p.67-83. 2005.

Ledoux, J. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biol Psychiatry**, v.44, n.12, Dec 15, p.1229-1238. 1998.

Ledoux, J. E. Emotional memory systems in the brain. **Behav Brain Res**, v.58, n.1-2, Dec 20, p.69-79. 1993.

Lichtman, A. H., Dimen, K. R. e Martin, B. R. Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.119, n.3, Jun, p.282-290. 1995.

Lichtman, A. H. e Martin, B. R. Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. **Psychopharmacology (Berl)**, v.126, n.2, Jul, p.125-131. 1996.

Lichtman, A. H. SR 141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. **Eur J Pharmacol**, v.404, n.1-2, Sep 15, p.175-179. 2000.

Lin, C. H., Yeh, S. H., Leu, T. H., Chang, W. C., Wang, S. T. e Gean, P. W. Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. **J Neurosci**, v.23, n.5, Mar 1, p.1574-1579. 2003a.

Lin, C. H., Yeh, S. H., Lu, H. Y. e Gean, P. W. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. **J Neurosci**, v.23, n.23, Sep 10, p.8310-8317. 2003b.

Loftus, E. F. e Palmer, J. C. Reconstruction of automobile destruction: An example of interaction between language and memory. **Journal of Verbal Learning & Verbal Behavior**, v.13, p.585-589. 1974.

Lucas, V. S., Jr. e Laszlo, J. delta 9-Tetrahydrocannabinol for refractory vomiting induced by cancer chemotherapy. **Jama**, v.243, n.12, Mar 28, p.1241-1243. 1980.

Lynn, A. B. e Herkenham, M. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. **J Pharmacol Exp Ther**, v.268, n.3, Mar, p.1612-1623. 1994.

Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R. e Mitchell, R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. **J Neurosci**, v.15, n.10, Oct, p.6552-6561. 1995.

Makriyannis, A., Mechoulam, R. e Piomelli, D. Therapeutic opportunities through modulation of the endocannabinoid system. **Neuropharmacology**, v.48, n.8, Jun, p.1068-1071. 2005.

Malinow, R. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.358, n.1432, Apr 29, p.707-714. 2003.

Mallet, P. E. e Beninger, R. J. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A attenuates the memory impairment produced by delta9-tetrahydrocannabinol or anandamide. **Psychopharmacology (Berl)**, v.140, n.1, Nov, p.11-19. 1998.

Maren, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annu Rev Neurosci**, v.24, p.897-931. 2001.

Marsicano, G., Wotjak, C. T., Azad, S. C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M. G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglansberger, W., Di Marzo, V. e Lutz, B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature**, v.418, n.6897, Aug 1, p.530-534. 2002.

Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. e Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v.346, n.6284, Aug 9, p.561-564. 1990.

Mazzola, C., Micale, V. e Drago, F. Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. **Eur J Pharmacol**, v.477, n.3, Sep 23, p.219-225. 2003.

Mechiel Korte, S. e De Boer, S. F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. **Eur J Pharmacol**, v.463, n.1-3, Feb 28, p.163-175. 2003.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R. e Et Al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochem Pharmacol**, v.50, n.1, Jun 29, p.83-90. 1995.

Milad, M. R. e Quirk, G. J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. **Nature**, v.420, n.6911, Nov 7, p.70-74. 2002.

Mishima, K., Egashira, N., Hirose, N., Fujii, M., Matsumoto, Y., Iwasaki, K. e Fujiwara, M. Characteristics of learning and memory impairment induced by delta9-tetrahydrocannabinol in rats. **Jpn J Pharmacol**, v.87, n.4, Dec, p.297-308. 2001.

Murillo-Rodriguez, E., Sanchez-Alavez, M., Navarro, L., Martinez-Gonzalez, D., Drucker-Colin, R. e Prospero-Garcia, O. Anandamide modulates sleep and memory in rats. **Brain Res**, v.812, n.1-2, Nov 23, p.270-274. 1998.

Nader, K., Schafe, G. E. e Le Douarin, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v.406, n.6797, Aug 17, p.722-726. 2000.

Nader, K. Memory traces unbound. **Trends Neurosci**, v.26, n.2, Feb, p.65-72. 2003.

Noe, S. N., Newton, C., Widen, R., Friedman, H. e Klein, T. W. Anti-CD40, anti-CD3, and IL-2 stimulation induce contrasting changes in CB1 mRNA expression in mouse splenocytes. **J Neuroimmunol**, v.110, n.1-2, Oct 2, p.161-167. 2000.

O'Shaugnessy, W. B. On the Cannabis indica or indian hemp. **Pharmacol J Trans**, v.2, p.594. 1843.

Pacheco, M., Childers, S. R., Arnold, R., Casiano, F. e Ward, S. J. Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v.257, n.1, Apr, p.170-183. 1991.

Pamplona, F. A. e Takahashi, R. N. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. **Neurosci Lett**, v.in press. 2006.

Pare, D., Quirk, G. J. e Ledoux, J. E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **J Neurophysiol**, v.92, n.1, Jul, p.1-9. 2004.

Parker, L. A., Burton, P., Sorge, R. E., Yakiwchuk, C. e Mechoulam, R. Effect of low doses of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.175, n.3, Sep, p.360-366. 2004.

Patel, N. A., Moldow, R. L., Patel, J. A., Wu, G. e Chang, S. L. Arachidonylethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain. **Brain Res**, v.797, n.2, Jun 29, p.225-233. 1998.

Patel, S., Roelke, C. T., Rademacher, D. J. e Hillard, C. J. Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. **Eur J Neurosci**, v.21, n.4, Feb, p.1057-1069. 2005.

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. e Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v.14, n.3, Aug, p.149-167. 1985.

Pellow, S. e File, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v.24, n.3, Mar, p.525-529. 1986.

Pertwee, R. G. The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. **Aaps J**, v.7, n.3, p.E625-654. 2005a.

Pertwee, R. G. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. **Life Sci**, v.76, n.12, Feb 4, p.1307-1324. 2005b.

Phillips, R. G. e Ledoux, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behav Neurosci**, v.106, n.2, Apr, p.274-285. 1992.

Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, v.4, n.11, Nov, p.873-884. 2003.

Porter, A. C., Sauer, J. M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Bernal, M. J., Bao, J., Nomikos, G. G., Carter, P., Bymaster, F. P., Leese, A. B. e Felder, C. C. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. **J Pharmacol Exp Ther**, v.301, n.3, Jun, p.1020-1024. 2002.

Reibaud, M., Obinu, M. C., Ledent, C., Parmentier, M., Bohme, G. A. e Imperato, A. Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. **Eur J Pharmacol**, v.379, n.1, Aug 20, p.R1-2. 1999.

Renault, P. F., Schuster, C. R., Freedman, D. X., Sikic, B. e De Mello, D. N. Repeat administration of marijuana smoke to humans. **Arch Gen Psychiatry**, v.31, n.1, Jul, p.95-102. 1974.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Neliat, G., Caput, D. e Et Al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. **FEBS Lett**, v.350, n.2-3, Aug 22, p.240-244. 1994.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Congy, C., Martinez, S., Oustric, D., Perio, A., Poncelet, M., Maruani, J., Arnone, M., Finance, O., Soubrie, P. e Le Fur, G. SR147778 [5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidinyl)-1H-pyr azole-3-carboxamide], a new potent and selective antagonist of the CB1 cannabinoid receptor: biochemical and pharmacological characterization. **J Pharmacol Exp Ther**, v.310, n.3, Sep, p.905-914. 2004.

Robson, P. Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. **Br J Psychiatry**, v.178, Feb, p.107-115. 2001.

Rodriguez De Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A. e Navarro, M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. **Alcohol Alcohol**, v.40, n.1, Jan-Feb, p.2-14. 2005.

Rodriguez, J. J., Mackie, K. e Pickel, V. M. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. **J Neurosci**, v.21, n.3, Feb 1, p.823-833. 2001.

Rothbaum, B. O. e Schwartz, A. C. Exposure therapy for posttraumatic stress disorder. **Am J Psychother**, v.56, n.1, p.59-75. 2002.

Rueda, D., Galve-Roperh, I., Haro, A. e Guzman, M. The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. **Mol Pharmacol**, v.58, n.4, Oct, p.814-820. 2000.

Schafe, G. E., Nader, K., Blair, H. T. e Ledoux, J. E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. **Trends Neurosci**, v.24, n.9, Sep, p.540-546. 2001.

Schnelle, M., Grotenhermen, F., Reif, M. e Gorter, R. W. [Results of a standardized survey on the medical use of cannabis products in the German-speaking area]. **Forsch Komplementarmed**, v.6 Suppl 3, Oct, p.28-36. 1999.

Segal, M. e Andersen, P. Dendritic spines shaped by synaptic activity. **Curr Opin Neurobiol**, v.10, n.5, Oct, p.582-586. 2000.

Shearman, L. P., Rosko, K. M., Fleischer, R., Wang, J., Xu, S., Tong, X. S. e Rocha, B. A. Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice. **Behav Pharmacol**, v.14, n.8, Dec, p.573-582. 2003.

Solvay-Pharmaceuticals. De acordo com pesquisa realizada em 09 de janeiro de 2006 no endereço <http://www.marinol.com> 2006.

Struwe, M., Kaempfer, S. H., Geiger, C. J., Pavia, A. T., Plasse, T. F., Shepard, K. V., Ries, K. e Evans, T. G. Effect of dronabinol on nutritional status in HIV infection. **Ann Pharmacother**, v.27, n.7-8, Jul-Aug, p.827-831. 1993.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A. e Waku, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v.215, n.1, Oct 4, p.89-97. 1995.

Sullivan, J. M. Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. **Learn Mem**, v.7, n.3, May-Jun, p.132-139. 2000.

Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J. e Kida, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **J Neurosci**, v.24, n.20, May 19, p.4787-4795. 2004.

Takahashi, R. N., Pamplona, F. A. e Fernandes, M. S. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. **Neurosci Lett**, v.380, n.3, Jun 3, p.270-275. 2005.

Takahashi, T., Svoboda, K. e Malinow, R. Experience strengthening transmission by driving AMPA receptors into synapses. **Science**, v.299, n.5612, Mar 7, p.1585-1588. 2003.

Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Piersanti, G., Mor, M., Rivara, S., Plazzi, P. V., Park, C., Kathuria, S. e Piomelli, D. Design, synthesis, and structure-activity relationships of alkylcarbamic acid aryl esters, a new class of fatty acid amide hydrolase inhibitors. **J Med Chem**, v.46, n.12, Jun 5, p.2352-2360. 2003.

Tennant, F. S., Jr. e Groesbeck, C. J. Psychiatric effects of hashish. **Arch Gen Psychiatry**, v.27, n.1, Jul, p.133-136. 1972.

Terranova, J. P., Storme, J. J., Lafon, N., Perio, A., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G. e Soubrie, P. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. **Psychopharmacology (Berl)**, v.126, n.2, Jul, p.165-172. 1996.

Toni, N., Buchs, P. A., Nikonenko, I., Bron, C. R. e Muller, D. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. **Nature**, v.402, n.6760, Nov 25, p.421-425. 1999.

Tramer, M. R., Carroll, D., Campbell, F. A., Reynolds, D. J., Moore, R. A. e Mcquay, H. J. Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review. **Bmj**, v.323, n.7303, Jul 7, p.16-21. 2001.

Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M. C., Mackie, K. e Walker, J. M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v.83, n.2, Mar, p.393-411. 1998.

Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D. e Sharkey, K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. **Science**, v.310, n.5746, Oct 14, p.329-332. 2005.

Varvel, S. A. e Lichtman, A. H. Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. **J Pharmacol Exp Ther**, v.301, n.3, Jun, p.915-924. 2002.

Varvel, S. A., Anum, E. A. e Lichtman, A. H. Disruption of CB(1) receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.179, n.4, Jun, p.863-872. 2005.

Vogel, Z., Barg, J., Levy, R., Saya, D., Heldman, E. e Mechoulam, R. Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. **J Neurochem**, v.61, n.1, Jul, p.352-355. 1993.

Wadman, M. Appetite downer awaits approval. **Nature**, v.437, n.7059, Sep 29, p.618-619. 2005.

Walker, J. M. e Huang, S. M. Cannabinoid analgesia. **Pharmacol Ther**, v.95, n.2, Aug, p.127-135. 2002.

Wolff, M. C. e Leander, J. D. SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. **Eur J Pharmacol**, v.477, n.3, Sep 23, p.213-217. 2003.

Yaniv, D., Desmedt, A., Jaffard, R. e Richter-Levin, G. The amygdala and appraisal processes: stimulus and response complexity as an organizing factor. **Brain Res Brain Res Rev**, v.44, n.2-3, Mar, p.179-186. 2004.

**ANEXO – PUBLICAÇÃO DE PARTE DOS RESULTADOS EM
PERIÓDICO CIENTÍFICO QUALIS “A”**